

Université de Montréal

Évaluation de la toxicité de combinaisons de métaux
sur l'uréase et la déshydrogénase dans le sol

par

Sophie Chaperon

Département de chimie, Université de Montréal

Facultés des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)
en chimie

décembre, 2005

©, Sophie Chaperon, 2005



①

3

U54

2006

V.011

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Évaluation de la toxicité de combinaisons de métaux
sur l'uréase et la déshydrogénase dans le sol

Présenté par :

Sophie Chaperon

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dominic Rochefort
président-rapporteur

Sébastien Sauvé
directeur de recherche

Kevin J. Wilkinson
membre du jury

SOMMAIRE

La toxicité individuelle et conjuguée de métaux traces a été évaluée sur l'activité enzymatique de deux sols forestiers et d'un sol agricole. Deux enzymes représentatives du cycle des nutriments des sols, la déshydrogénase et l'uréase, ont servi de biomarqueurs pour évaluer l'impact de la combinaison des métaux. Les interactions entre le cadmium, le cuivre et le plomb de même que les interactions entre l'argent, le cuivre, le mercure et le zinc ont été étudiées. Des mesures de spéciation des métaux ont été réalisées parallèlement pour intégrer la variabilité de la chimie des sols. Les résultats montrent que la combinaison des métaux a un effet sur l'activité des ions métalliques libres en solution. Une addition de Pb à un sol contenant du Cu engendre une diminution de l'activité du Cu^{2+} libre dans la phase aqueuse. Cette diminution d'activité entraîne par conséquent une stimulation de l'activité enzymatique. La comparaison des concentrations dissoutes de Ag, Cu, Hg et Zn entre un sol forestier et un sol agricole a montré que des teneurs plus élevées en métaux étaient mesurées pour le sol agricole, moins riche en matière organique. Dans ce sol, la toxicité enzymatique observée est également plus élevée. La toxicité des mélanges observée a par la suite été comparée à des valeurs calculées avec des modèles d'actions conjuguées. Les modèles de l'indépendance de Bliss et de l'addition de Loewe ont été utilisés. Des effets de combinaison antagonistes ont été observés dans les deux sols forestiers et des effets synergiques ont été observés dans le sol agricole. Ces différences peuvent être expliquées par les caractéristiques physico-chimiques de chaque sol.

Mots clés : Métaux traces; Toxicité des mélanges; Spéciation; Essais enzymatiques;
Modèles d'actions conjuguées

SUMMARY

The toxicity of trace metals alone and in combination was assessed to the soil enzymes dehydrogenase and urease. We assayed the enzymatic response of two forest soils and one agricultural soil. The interaction between cadmium, copper and lead in addition of the interaction between silver, copper, mercury and zinc was studied. The speciation of the metals was measured concurrently in order to consider the effect of soil chemistry on the enzyme activities. Results show that metal combinations have an effect on free metallic ion activities in solution. An addition of Pb to a Cu-spiked soil gives lower free Cu^{2+} in the aqueous phase. Therefore, a stimulation of the enzymatic activities was observed. The comparison of dissolved concentrations of Ag, Cu, Hg and Zn between a forest soil and an agricultural soil revealed higher metal concentrations in the agricultural soil which has less organic matter. In the latter soil we also measured higher enzyme toxicities. Then, the toxicity interaction of the metal mixtures was predicted according to the classical Bliss independence and Loewe additivity models. Predictions were compared to the observed enzymatic responses. Results show antagonistic metal interactions for the two forest soils and synergistic metal interactions for the agricultural soil. The differences could be explained by the physicochemical characteristics of each soil.

Keywords: Trace metals; Mixture toxicity; Speciation; Enzyme assay; Joint action models

TABLE DES MATIÈRES

Le mémoire est rédigé en français hormis les 2 articles reproduits tels que soumis ou en prévision de l'être, soit en anglais. Les articles sont suivis de leur bibliographie respective alors que les références utilisées dans les différentes parties en français sont rassemblées dans une section bibliographique à la fin du mémoire.

SOMMAIRE	iii
SUMMARY	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
REMERCIEMENTS	x
1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Problématique.....	1
1.2 Biodisponibilité des métaux dans le sol	2
1.2.1 Spéciation chimique : rôle de l'ion libre	3
1.2.2 Détermination de la spéciation des métaux dans une solution de sol ...	5
1.3 Métaux à l'étude.....	7
1.3.1 L'argent	8
1.3.2 Le cadmium.....	9
1.3.3 Le cuivre.....	11
1.3.4 Le mercure.....	12
1.3.5 Le plomb.....	15
1.3.6 Le zinc	16
1.4 Les biomarqueurs	16
1.4.1 La déshydrogénase	20
1.4.2 L'uréase	22
1.5 Évaluation des effets des métaux individuels.....	23
1.6 Étude des effets des mélanges	26
1.6.1 Terminologie	27

1.6.2	Indépendance de Bliss	29
1.6.3	Addition de Loewe	29
1.6.4	Choix du modèle	31
2	TOXICITÉ DES MÉTAUX COMBINÉS (Cd, Cu, Pb) SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE.....	32
2.1	Avant-propos	32
2.2	Abstract	33
2.3	Introduction	34
2.4	Material & Methods	36
2.5	Results	41
2.6	Discussion	48
2.7	Acknowledgements	50
2.8	References	51
3	TOXICITÉ DES MÉTAUX COMBINÉS (Ag, Cu, Hg, Zn) SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE.....	56
3.1	Avant-propos	56
3.2	Abstract	57
3.3	Introduction	58
3.4	Material & Methods	60
3.5	Results	64
3.6	Discussion	73
3.7	References	75
4	CONCLUSION	80
5	BIBLIOGRAPHIE	82

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Teneurs de fond en métaux pour les sols du Québec et recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement	8
Tableau II. Action conjuguée des mélanges.....	28
Tableau III. Consensus sur la terminologie d'agents combinés.....	28
Table IV. Measured dose-response curve parameters for individual metals of each bioassay	43
Table V. Comparison of predicted data and measured data for dehydrogenase activity	46
Table VI. Comparison of predicted data and measured data for urease activity	47
Table VII. Selected characteristics of soils.	60
Table VIII. Estimated dose-response curve parameters for single metals of each bioassay in the forest soil	67
Table IX. Estimated dose-response curve parameters for single metals of each bioassay in the agricultural soil	68
Table X. Comparison of predicted and measured responses for enzyme assays using Bliss independence models for the exposure of total and dissolved metals in the forest soil.	71
Tableau XI. Comparison of predicted and measured responses for enzyme assays using Bliss independence models for the exposure of total and dissolved metals in the agricultural soil.....	72

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation du modèle du ligand biotique.....	4
Figure 2. Représentation du fractionnement des métaux en phase solide et de la spéciation chimique en phase aqueuse	5
Figure 3. Représentation du cycle du Cd dans le sol, les plantes et la chaîne alimentaire	11
Figure 4. Représentation de l'activité enzymatique dans le sol	18
Figure 5. Composantes de l'activité enzymatique du sol.....	18
Figure 6. Relation dose-réponse.....	24
Figure 7. Relation dose-réponse en présence d'hormésis.	25
Figure 8. Courbe dose-réponse hypothétique démontrant l'incohérence d'un simple modèle additif pour prédire la toxicité de la combinaison de A et B.	27
Figure 9. Dose-response curves of dehydrogenase and urease activity as a function of the mean log free dose of 4 replicates for each individual metal.	42
Figure 10. Effect of lead on copper speciation.....	44
Figure 11. Observed effect of lead and copper on urease activity	45
Figure 12. Comparison of predicted and measured data for dehydrogenase activity .	46
Figure 13. Comparison of predicted and measured data for urease activity	47
Figure 14. Dose-response curves of dehydrogenase activity as a function of the mean log total dose of 4 replicates for each individual total metal for the forest soil. .	65
Figure 15. Dose-response curves of urease activity as a function of the mean log total dose of 4 replicates for each individual total metal for the forest soil.	66
Figure 16. Comparison of Dehydrogenase responses as a function of total metal combinations between an agricultural and a forest soil.....	70

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BLM	Modèle du ligand biotique
CEAEQ	Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
CCME	Conseil canadien des ministres de l'environnement
CEC	Capacité d'échange cationique
COD	Carbone organique dissous
ED ₅₀	Dose causant un effet pour 50% de la population
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
L	Ligand
LD ₅₀	Dose létale pour 50% de la population
M ^{z+}	Ion métallique libre de charge z
MOD	Matière organique dissoute
TPF	Triphénylformazan
TTC	Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium
USEPA	U.S. Environmental Protection Agency
WHC	Capacité de rétention d'eau d'un sol

REMERCIEMENTS

Je veux tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le professeur Sébastien Sauvé, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma maîtrise dans son groupe. La latitude et les conseils scientifiques qu'il m'a fournis ont été déterminants dans le cheminement de mes travaux. Je voudrais également le remercier pour m'avoir permis de relever de nouveaux défis à l'autre bout du monde.

Merci à Binana Madikama, Matthieu François, Daniela Minailiuc, Karine Gendron, Marylène Dussault, Pedro A. Segura et Carmen Donisa pour avoir participé à la réalisation de ce projet de recherche. Merci aussi à tous mes collègues de laboratoire pour l'ambiance de travail et les discussions animées.

Je tiens également à remercier les équipes des professeurs François Courchesne, William Hendershot, Marc Amyot et Richard Carignan pour les analyses chimiques effectuées.

La réussite de mes études n'aurait pu se réaliser sans le soutien inconditionnel de ma famille. Merci à mes parents, Jean-Marie et Monique, de même qu'à mon frère Patrick et à ma grand-mère Madeleine. Je tiens à les remercier de tout mon cœur pour leurs encouragements et leur écoute.

Merci à Christian pour m'avoir accompagnée tout au long de ce projet. Ta détermination, tes conseils constructifs et ta compréhension m'ont aidée à me surpasser.

Enfin, ce projet a été rendu possible grâce à l'appui financier du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada de même que le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies.

1 INTRODUCTION

1.1 Problématique

La réglementation environnementale actuellement en vigueur pour les sols contaminés est basée sur les effets toxiques potentiellement engendrés par les différentes substances présentes dans les sols. La faiblesse de l'approche actuelle provient de l'évaluation de la toxicité selon chaque polluant individuel sans égard à leur biodisponibilité. Or, un nombre croissant d'études démontrent l'importance d'intégrer la spéciation chimique, les conditions physico-chimiques et le rôle de l'ion libre dans l'évaluation de la toxicité observée. De plus, la grande majorité des sites contaminés contiennent une multitude de composantes toxiques et on ne tient pas compte de l'interaction possible entre ces substances. Selon les rares données disponibles pour les sols ainsi que la littérature sur la toxicologie aquatique, ces interactions peuvent s'avérer cumulatives, antagonistes ou synergiques (Preston et al., 2000). Les effets cumulatifs surviennent lorsque la toxicité du mélange équivaut à la somme de la toxicité de chaque polluant individuel. Les interactions synergiques et antagonistes surviennent quand la toxicité du mélange est respectivement supérieure ou inférieure à la somme de la toxicité engendrée par chaque composé individuel. Ainsi, le but de cette étude consiste à évaluer les effets d'interactions de différents métaux traces sur des biomarqueurs dans des sols distincts et ce en intégrant les notions de biodisponibilité. Les interactions entre le cadmium, le cuivre et le plomb sont étudiées de même que les interactions entre l'argent, le cuivre, le mercure et le zinc. Les biomarqueurs sélectionnés sont deux enzymes représentatives du cycle des éléments nutritifs dans les sols soit l'uréase et la déshydrogénase. L'uréase catalyse la transformation de l'urée en ammoniac et la déshydrogénase catalyse le transfert d'électrons dans la majorité des réactions d'oxydoréduction.

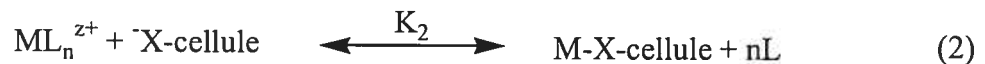
1.2 Biodisponibilité des métaux dans le sol

L'accumulation de métaux traces dans le sol, l'eau ou l'air présente un risque important pour la santé humaine et celle de notre écosystème. Afin d'évaluer ce risque, des modèles de toxicité biologique et biochimique ont été élaborés. La plupart de ces modèles ont été établis en fonction des concentrations en métaux totaux. Toutefois, il y a maintenant un consensus sur la nécessité d'intégrer le concept de biodisponibilité des métaux dans les évaluations de risque environnemental. Malheureusement, plusieurs définitions du terme « biodisponibilité » existent. La définition que nous avons retenue est : « Quantité ou concentration d'un composé qui peut être adsorbée par un organisme et qui peut, par conséquent, créer un potentiel de toxicité ou apporter une concentration nécessaire à sa survie » (Parametrix, 1995). Cette définition permet d'intégrer la dualité entre la quantité essentielle à la survie d'un organisme et l'excès provoquant des effets toxicologiques (Sauvé, 2002). Pour déterminer cette quantité biodisponible, la spéciation des métaux est utilisée. Selon l'IUPAC la spéciation est une distribution d'un élément en des formes chimiques définies dans un système. À titre d'exemple, les formes chimiques comme le zinc libre, le sulfate de zinc ou le chlorure de zinc font partie de la spéciation de ce métal. L'intérêt concernant la détermination des quantités et des formes chimiques biodisponibles provient du fait que de nombreuses études ont démontré que l'ion métallique libre (M^{z+}) est corrélé à la toxicité observée (Campbell, 1995; Sauvé et al., 1998; Cheng et Allen, 2001). Dans le milieu aquatique, les modèles incluant les notions de biodisponibilité et de spéciation ont évolué au point d'être intégrés à la réglementation de certains pays (Nolan et al., 2003). Au niveau de l'environnement terrestre, moins de progrès ont été réalisés puisque le milieu est plus complexe et qu'il faut considérer la nature hétérogène des sols, les équilibres dynamiques entre les phases aqueuse et solide et l'exposition des organismes à des métaux présents dans les états solide, liquide et gazeux. Toutefois, les résultats des études disponibles permettent d'affirmer que les métaux biodisponibles pour les organismes du sol se retrouvent essentiellement dans la phase aqueuse (Sauvé, 2002; Nolan et al., 2003). Dans cette phase aqueuse, la forme métallique libre (M^{z+}) est souvent la mieux

associée à la toxicité. Ainsi, la forme libre est prépondérante dans les milieux aquatique et terrestre comme espèce biodisponible.

1.2.1 Spéciation chimique : rôle de l'ion libre

Au niveau aquatique, le modèle du ligand biotique (BLM) et le modèle de l'ion libre (FIAM-Free Ionic Aquatic Model) sont les plus robustes pour conceptualiser les interactions entre les métaux et les organismes. En fait, ce sont deux modèles mathématiquement équivalents qui se distinguent dans la conception de la compétition entre les ions (Slaveykova and Wilkinson, 2005). En attendant l'évolution des BLM terrestres, les modèles aquatiques sont en partie valables pour les sols puisque les formes biodisponibles se situent dans la phase aqueuse. La théorie à la base de ces modèles suppose que (i) la toxicité des métaux peut être majoritairement expliquée par la toxicité engendrée par l'ion libre; (ii) la complexation des métaux libres avec les ligands inorganiques et la matière organique naturelle diminue la toxicité des métaux en diminuant l'activité de l'ion libre; (iii) les différents paramètres de la qualité des eaux affectent la toxicité des métaux par un effet sur les organismes et la spéciation des métaux; (iv) les cations durs sont spécifiquement protecteurs puisqu'il y a compétition avec l'ion libre pour les sites de liaison de l'organisme (Niyogi et Wood, 2004). Selon le FIAM (Campbell, 1995), la réponse biologique d'un organisme à un métal serait proportionnelle à sa concentration sous la forme métallique libre (M^{z+}). Pour que le métal s'accumule dans l'organisme et provoque une réponse biologique, il doit entrer en contact avec un ligand présent à la surface cellulaire (\bar{X} -cellule). Cette réaction peut impliquer l'ion métallique M^{z+} ou une forme réactive ML_n^{z+} où L représente un ligand (Campbell, 1995) :



La forme réactive sera plus ou moins biodisponible, tel qu'illustré à la Figure 1, selon l'équilibre avec les complexes formés et la compétition entre les différents cations.

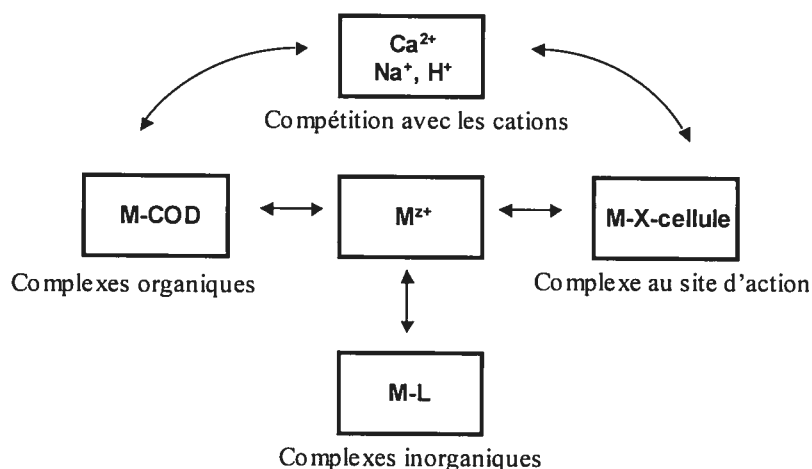


Figure 1. Représentation du modèle du ligand biotique. Figure adaptée de Di Torro (2001).

Au niveau terrestre, la distribution des formes chimiques est influencée par de nombreux processus comme la sorption, la complexation ou la précipitation. De surcroît, ces processus dépendent des propriétés du métal, du type de sol et des conditions physico-chimiques comme le pH, la concentration en matière organique ou en cations majeurs. À titre d'exemple, une diminution de pH favorise la formation des ions métalliques libres et la précipitation de la matière organique; une augmentation de pH favorise la formation des complexes hydroxydes et des complexes avec la matière organique dissoute (MOD). Tous ces facteurs ajoutent un niveau de difficulté à l'élaboration d'un modèle de ligand biotique terrestre qui pourrait prédire facilement les formes et les quantités chimiques biodisponibles et potentiellement toxiques pour un organisme. La Figure 2 illustre tout de même une représentation possible du fractionnement des métaux en phase solide et de la spéciation des métaux en phase aqueuse. Le terme fractionnement est employé pour identifier la liaison des métaux avec les différentes phases solides de la matrice. L'ion métallique libre en solution est au centre des équilibres. Cet ion libre peut devenir

absent de la phase aqueuse en s'adsorbant à la surface de différentes phases solides comme les oxydes ou la matière organique. Il peut aussi y avoir formation d'un précipité secondaire lorsque le produit de solubilité d'un métal en solution est excédé; par exemple l'ajout de phosphate à un sol contaminé en plomb entraîne la formation d'un précipité insoluble (Sauvé, 2002). Enfin, malgré tous ces équilibres, l'ion métallique libre demeure une forme majeure à considérer dans l'évaluation de la toxicité d'un métal pour un organisme. Par conséquent, il importe de le quantifier adéquatement.

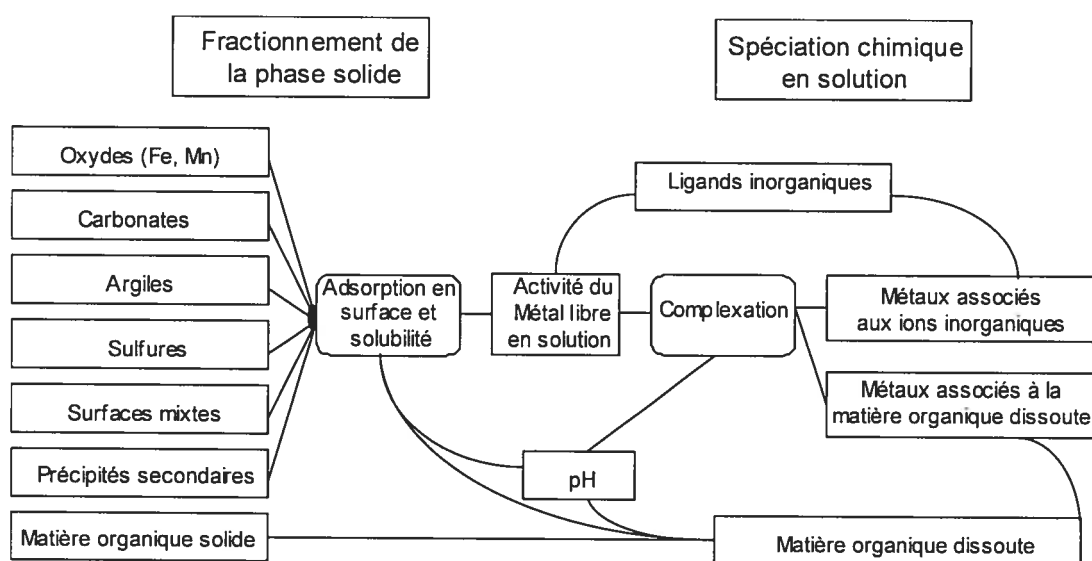


Figure 2. Représentation du fractionnement des métaux en phase solide et de la spéciation chimique en phase aqueuse. Figure adaptée de Sauvé (2002).

1.2.2 Détermination de la spéciation des métaux dans une solution de sol

La solution de sol est la phase liquide à laquelle les plantes et les organismes du sol sont exposés. La méthode la plus simple pour obtenir cette solution de sol est la centrifugation. Toutefois, les quantités obtenues sont nettement insuffisantes pour réaliser adéquatement des recherches en laboratoire où environ 40 mL sont nécessaires. Une alternative est de reproduire une solution de sol par une technique d'extraction avec de l'eau ou une solution d'un sel suivie d'une centrifugation. Dans

la littérature, de nombreux sels avec des forces ioniques différentes sont employés. Il n'existe pas de protocole standard puisque la solution est sélectionnée selon le milieu étudié. Tout de même, il y a consensus sur la nécessité de réaliser les mesures de spéciation le plus rapidement possible après l'extraction de la solution de sol. Le problème majeur est le dégazage du CO_2 après la séparation de la solution puisque la pression partielle de CO_2 dans la phase gazeuse du sol est plus élevée que la pression atmosphérique (Nolan et al., 2003). Une perte de CO_2 entraîne une diminution de la quantité de bicarbonates dans le sol et il s'ensuit une augmentation de la valeur du pH. Or, tel que mentionné précédemment, le pH influence grandement les mesures de spéciation.

De nombreuses méthodes analytiques ont été développées pour mesurer la spéciation des métaux. Les principes sont basés sur des propriétés électrochimiques comme la potentiométrie ou la voltampérométrie, sur des propriétés chimiques telles que les résines échangeuses d'ions et les extractions par solvant et sur des propriétés physiques comme l'ultrafiltration et la dialyse. Il y a également des modèles informatiques conçus à partir des constantes thermodynamiques de différentes réactions impliquées dans la spéciation d'un métal. Toutes ces méthodes présentent des avantages et des inconvénients que ce soit au niveau des interférences chimiques, de la sensibilité ou de la sélectivité. Le choix d'une méthode s'effectue en fonction des métaux à analyser et des caractéristiques spécifiques du milieu. Pour notre projet, nous avons choisi deux méthodes électrochimiques puisque ces méthodes sont suffisamment sensibles pour nos sols contaminés, elles sont simples et bien développées pour des matrices complexes. Ainsi, une méthode potentiométrique utilisant une électrode sélective a été utilisée pour mesurer le Cu^{2+} en solution (Sauvé et al., 1995). La seconde méthode employée est la polarographie anodique impulsométrique différentielle. Cette technique mesure les métaux labiles en solution. Ce qui signifie que les ions libres et les complexes inorganiques rapidement dissociables sont mesurés. Les teneurs en ions métalliques libres peuvent être obtenues à partir des constantes de formation des réactions inorganiques, des concentrations en anions, du pH ainsi que de la conductivité.

1.3 Métaux à l'étude

Plus de 80 éléments du tableau périodique présentent un caractère métallique et potentiellement toxique pour les organismes vivants. Certains de ces éléments sont essentiels à l'état trace pour le fonctionnement optimal des cellules et d'autres comme le cadmium, le mercure ou le plomb sont xénobiotiques et occasionnent de sérieux problèmes de toxicité à faible dose. Les métaux sont présents naturellement dans l'environnement mais les dépôts anthropiques sont à l'origine des préoccupations croissantes pour ces éléments. Les principales sources de métaux d'origine anthropique sont : la combustion de pétrole, les industries manufacturières, les activités minières, les déchets (dépotoirs, boues d'épuration, voitures usées, batteries), l'agriculture (engrais, pesticides, purins) et l'activité forestière. Les trois dernières sources entraînent également des problèmes d'érosion et de lixiviation, ce qui facilite le transport des métaux vers les eaux de surface. Au niveau des sols agricoles, Alloway (1990) a exprimé le contenu total en métaux selon l'expression suivante :

$$M_{\text{total}} = (M_{\text{mp}} + M_{\text{a}} + M_{\text{e}} + M_{\text{ca}} + M_{\text{do}} + M_{\text{pi}}) - (M_{\text{re}} + M_{\text{p}}) \quad (3)$$

où « M » représente la concentration en métal, « mp » le matériel parent, « a » les dépôts atmosphériques, « e » les engrais, « ca » les composés chimiques agricoles, « do » les déchets organiques, « pi » les autres polluants inorganiques, « re » le retrait dû aux récoltes et « p » les pertes occasionnées par la lixiviation et la volatilisation.

En plus d'être omniprésents, les métaux s'accumulent dans les organismes et ne sont pas dégradables. Toutefois, chez l'humain et certains animaux et espèces aquatiques, l'accumulation de métaux n'engendre pas systématiquement des effets toxiques. Par exemple, le cadmium et d'autres métaux forment un complexe inerte avec des groupements thiols de la métallothionéine, une protéine. Au-delà d'une concentration critique, les métaux vont cependant occasionner des effets toxiques en se fixant principalement aux groupements sulfhydriles d'enzymes spécifiques, ce qui a pour effet d'inhiber leur action. Le Tableau I indique les teneurs de fond de certains

métaux présents dans les sols du Québec et il indique également les recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement (CEAEQ, 1998; CCME, 2003).

Des critères pour la toxicité des enzymes ne peuvent pas être aussi bien définis puisqu'il y a trop de facteurs qui modifient les réponses enzymatiques. Tabatabai (1977) a montré toutefois que l'effet d'inhibition de 5 μmol de métaux par gramme de sol pour l'uréase décroît selon l'ordre suivant : $\text{Ag}^+ > \text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$. Welp (1999) a montré pour sa part que la déshydrogénase est inhibée par les métaux selon l'ordre suivant avec les valeurs de ED_{50} (mg.kg^{-1}) données entre parenthèses : Hg^{2+} (2,0) $> \text{Cu}^{2+}$ (35) $> \text{Cd}^{2+}$ (90) $> \text{Zn}^{2+}$ (115) $> \text{Pb}^{2+}$ (652). Welp ne mentionne pas l'effet de Ag^+ mais nous présumons que c'est le plus toxique puisque ce dernier est un puissant biocide.

Tableau I. Teneurs de fond en métaux pour les sols du Québec et recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement (CEAEQ, 1998; CCME, 2003).

Métal	Teneurs de fond (mg.kg^{-1})	Eau potable ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Sol résidentiel (mg.kg^{-1})	Sol commercial (mg.kg^{-1})	Sol Industriel (mg.kg^{-1})
Argent	0,5 - 2,0	-	20	40	40
Cadmium	0,9 - 1,5	5	10	22	22
Cuivre	40 - 100	-	63	91	91
Mercure	0,2 - 0,4	1	6,6	24	50
Plomb	30 - 50	10	140	260	260
Zinc	100 - 230	-	200	360	360

1.3.1 L'argent

L'argent est un métal précieux à haute importance économique. Ce métal est très prisé, entre autres pour les applications photographiques, ses capacités conductrices et sa stabilité à la chaleur dans la conception des alliages. L'argent est un élément du groupe 1B du tableau périodique tout comme le cuivre et l'or. Cet élément est retrouvé naturellement dans le sol sous formes de sulfures en association avec le plomb, le fer, le tellure ou même l'or (Purcell et Peters, 1998). La majorité de l'argent largué dans l'environnement provient des activités anthropiques; ce polluant demeure

en général près du site d'émission (>94%) soit dans le sol ou dans les boues d'épuration (Ratte, 1999). Il se réduit très facilement et n'est pas très soluble d'où sa faible biodisponibilité. Une quantité minime atteindra tout de même le milieu aquatique et demeurera en solution, complexée avec les formes chimiques et naturelles suivantes : sulfure, thiosulfate, chlorure, sulfate, MOD, colloïdes. En milieu salin, les complexes avec les chlorures dominant. Campbell (1995) rapporte même un cas où l'accumulation de l'Ag dans les crevettes est mieux corrélée avec le complexe AgCl qu'avec l'ion métallique libre. Le caractère lipophile du ligand inorganique AgCl amplifierait sa prise en charge par la membrane cellulaire. Toutefois, la toxicité de l'espèce cationique Ag^+ est plus répertoriée (Ratte, 1999; Bianchini et Wood, 2003; Wood et al., 1999). Sous cette forme, l'argent devient pratiquement le métal le plus toxique pour le bas de la chaîne trophique (microorganismes, enzymes, poissons, algues...), mais il est peu toxique pour l'humain. Ce métal est d'ailleurs utilisé comme agent bactéricide dans l'eau potable et pour le traitement des brûlures. Au niveau des effets, l'USEPA (1991) a établi une limite de $0,1 \text{ mg Ag L}^{-1}$ pour l'eau potable et le CCME (2003) ne pose aucune norme. L'USEPA établit cette norme pour des raisons esthétiques, puisqu'au delà de cette concentration il y a un risque de développer une *Argyria* soit une décoloration grise/bleue de la peau. Notre intérêt pour ce métal provient de sa toxicité élevée pour les enzymes étudiés dans le sol.

1.3.2 Le cadmium

De tous les métaux non essentiels, le cadmium est probablement le métal qui a reçu le plus d'attention dans la science du sol puisqu'il est très toxique pour l'homme à faible dose, il est relativement mobile dans ce milieu et donc plus disponible pour les plantes. Ces dernières peuvent également accumuler le cadmium sans démontrer d'effets de stress alors qu'à la même concentration l'ingestion de ces plantes est nocive pour l'homme. Le cadmium fait partie du groupe IIB du tableau périodique tout comme le zinc et le mercure. Ce métal est un acide de Lewis mou. Il forme des complexes solubles avec les amines, les imidazoles, les bromures, les chlorures, les iodures, les sulfhydryles, les thiols et certains acides organiques. Il forme également

des complexes solubles avec des bases de Lewis dures comme le sulfate, le bicarbonate et le phosphate (Traina, 1999). Toutefois, dans la plupart des sols plus de 99% du cadmium est associé à la phase solide et par conséquent moins de 1% se retrouve dans la solution de sol (Christensen et Haung, 1999). À l'état naturel, les gisements de cadmium sont rares et cet élément est plutôt retrouvé en association avec des sulfures et des carbonates de zinc. On retrouve aussi du Cd dans les gisements de phosphate ce qui est particulièrement préoccupant étant donné l'utilisation massive d'engrais phosphaté en agriculture. Le Cd est utilisé pour le placage de l'acier, pour certains pigments du plastique, comme stabilisateur dans les plastiques et dans les batteries. Dans l'environnement, les augmentations de concentrations en cadmium sont occasionnées par l'ajout d'engrais phosphatés, l'épandage, les boues d'épuration, les rejets industriels et agricoles et les dépôts atmosphériques. Au Canada, les fonderies et les opérations de raffinage génèrent 90% des émissions dans l'environnement (Environnement Canada, 1996). Le 10% d'émission résiduel est principalement généré par le Cd présent dans l'engrais phosphaté.

Au contact du sol, une des hypothèses émises est que le cadmium forme des complexes solubles et l'espèce toxique Cd^{2+} . Smolders et McLaughlin (1996) ont également observé que de hautes teneurs en chlorure (ex : $> 10\text{mM}$) dans le sol favorisent la mobilité du Cd^{2+} et la formation du complexe inorganique CdCl^+ qui peut être pris en charge par un canal cationique monovalent tel que le canal K^+ . En fait, tel qu'illustré à la Figure 3, le cycle du Cd est complexe et dépend de plusieurs processus et variables physico-chimiques.

Au niveau des effets toxiques, la tragédie du Japon nommée *Itai-itai* constitue un exemple de la toxicité du Cd. En effet, dans les années 50 une partie de la population du Japon était exposée à une source de Cd présente dans l'eau potable et plusieurs cas d'ostéoporose ont été signalés. On sait aujourd'hui que le Cd crée une déficience en calcium et qu'il nuit au fonctionnement des reins à une concentration accumulée

supérieure à 200mg Cd kg^{-1} (Alloway, 1990). Ainsi, nous avons sélectionné ce métal pour les risques de toxicité associés à sa prise en charge par l'être humain.

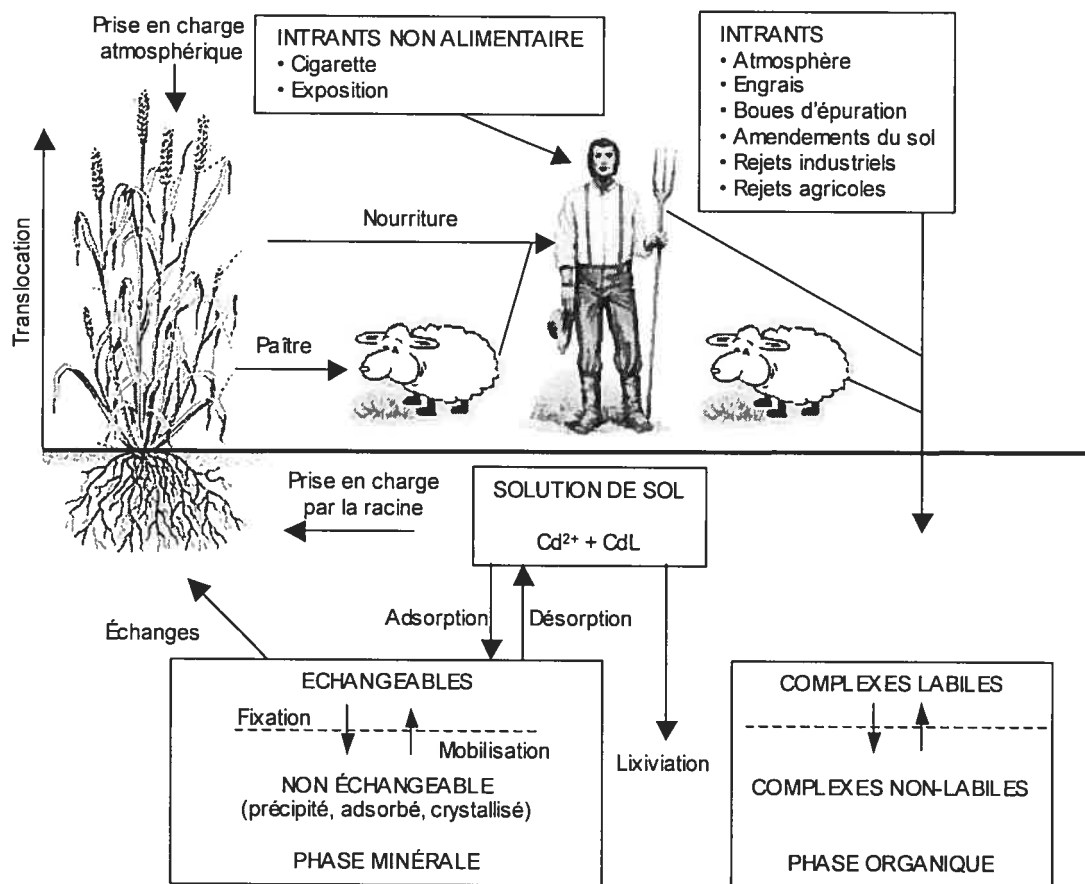


Figure 3. Représentation du cycle du Cd dans le sol, les plantes et la chaîne alimentaire. Figure adaptée et modifiée de McLaughlin et Singh (1999).

1.3.3 Le cuivre

Le cuivre est un élément essentiel aux plantes et animaux. Il fait partie du groupe IB tout comme l'argent et l'or. Le cuivre se situe dans des minéraux primaires et secondaires. On peut le retrouver sous sa forme métallique mais la majorité du cuivre se retrouve dans des minéraux primaires sulfurés comme la chalcopyrrite (CuFeS_2), la chalcocite (Cu_2S), la bornite (Cu_3FeS_4) et la tétrahédrite ($(\text{CuFe})_{12}\text{Sb}_4\text{S}_{13}$) (Environnement Canada, 1994). Le cuivre est également présent dans des minéraux secondaires tels que la cuprite (Cu_2O), la malachite ($\text{Cu}_2(\text{CO}_3)(\text{OH})_2$) et l'azurite

($\text{Cu}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$) (Environnement Canada, 1994). Le Cu est utilisé pour la plomberie, la peinture, comme conducteur électrique, dans les alliages, pour des ustensiles de cuisine, comme pesticide et dans le bois traité. Le sulfate de cuivre est utilisé dans l'engrais pour amender les sols déficients en cuivre. Dans l'environnement, le cuivre provient principalement des mines, des fonderies et du purin de porc.

Le Cu a la particularité de s'adsorber fortement aux particules du sol, il en résulte une très faible mobilité par rapport aux autres métaux traces et une longue persistance dans les sols. Baker (1990) classe l'affinité de cet élément pour les particules du sol selon l'ordre suivant : matière organique > oxydes de Fe, Mn, Al >>> minéraux d'argiles. En solution, plus de 98% du Cu est complexé à la matière organique dissoute (Environnement Canada, 1994). Le dernier 2% est associé à la présence de l'ion métallique libre Cu^{2+} , présent sous forme hexahydratée $(\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6)^{2+}$, et les complexes CuSO_4 , $\text{Cu}(\text{OH})_2$, CuCO_3 , CuCl , $\text{Cu}(\text{Cl}_2)^-$.

Le cuivre occupe une fonction essentielle chez les plantes, entre autres pour la photosynthèse et la fixation de l'azote. Une déficience en Cu affecte les récoltes par une décoloration des fruits et légumes, une perturbation de leur taille, de leur forme et de leur valeur nutritionnelle. Des teneurs trop élevées en Cu (ex : $>500 \text{ mg Cu kg}^{-1}$) impliquent des problèmes de croissance des plantes mais affectent également les invertébrés et la flore microbienne. Aux Etats-Unis, les boues d'épuration contiennent en moyenne $800 \text{ mg Cu kg}^{-1}$, ce qui montre l'importance de comprendre le cycle du cuivre et les effets toxiques associés (Baker, 1990). Chez l'humain, une surdose de cuivre entraîne des effets minimes tel que des diarrhées. Notre intérêt pour le cuivre provient principalement de la sensibilité de la flore microbienne pour ce métal.

1.3.4 Le mercure

Le mercure est le métal le plus toxique pour l'homme et le haut de la chaîne trophique alors qu'il ne présente pas de problèmes majeurs pour la phytotoxicité. Cet élément est retrouvé principalement dans un minéral nommé cinabre (HgS). Le

mercure peut être transformé naturellement par l'environnement. En effet, suite à l'activité volcanique, la dégradation des roches, l'érosion des sols, la dégradation biologique de la biomasse et les feux de forêt, le mercure est libéré sous forme $\text{Hg}_{(g)}$ (Olivier, 2002). Les retombées atmosphériques sont par la suite séquestrées par les systèmes terrestre et hydrique.

Le mercure est exploité en industrie pour de multiples usages. Ce métal étant liquide à la température de la pièce et possédant une dilatation régulière avec la température, il est utilisé dans la fabrication des thermomètres et dans les appareils de mesure. La conductivité électrique de ce métal permet l'utilisation dans les batteries et en électronique. Le mercure fait aussi partie du procédé chlore-alcali, qui consiste à fabriquer du chlore gazeux. Ces activités anthropiques génèrent évidemment des retombées dans l'environnement. Les principales sources de décharges sont l'exploitation des mines, la combustion du pétrole et du charbon, les rejets industriels et les incinérateurs pour la combustion des piles mortes non recyclées. Steinnes (1990) rapporte qu'environ 45% du mercure est émis dans l'atmosphère et 48 % dans le sol. Le milieu aquatique reçoit majoritairement le mercure par l'érosion des sols et les émissions atmosphériques.

La chimie du mercure est nettement différente de celles des autres métaux traces. Dépendamment des conditions redox, le Hg se présente sous trois différents états de valence soit Hg^0 , Hg_2^{2+} et Hg^{2+} (Steinnes, 1990). Dans l'environnement, les états Hg^0 et Hg^{2+} sont habituellement retrouvés mais Hg_2^{2+} est rarement sous forme ionique libre vu sa forte affinité pour les complexes. En plus du potentiel redox, le pH, le Cl^- , la MOD et les sulfures sont les paramètres qui influencent essentiellement la spéciation du Hg en solution. Les principales espèces de mercure formées dans un sol oxygène sont le $\text{Hg}(\text{OH})_2$, HgCl_2 , HgS , Hg^0 et HgOH^+ (Gabriel et Williamson, 2004). En milieu anoxique, les espèces HgSH^+ , HgOHSH et HgClSH sont principalement formées (Gabriel et Williamson, 2004). Plusieurs de ces espèces vont par la suite être complexées par des ligands organiques et des minéraux. L'importance de toutes ces espèces va dépendre des variables physico-chimiques énoncées. Par exemple, un pH

inférieur à 4 favorise l'espèce HgCl_2 , mais un pH supérieur à 5 favorise l'espèce $\text{Hg}(\text{OH})_2$ (Yin et al, 1996). Le HgCl_2 dominera également si une concentration supérieure à 10^{-6}M en Cl^- est présente.

Ensuite, une petite quantité du mercure total présent dans l'environnement terrestre forme du méthylmercure (CH_3Hg^+) et du diméthylmercure ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$). Le diméthylmercure est pratiquement insoluble dans l'eau et est très volatil. Puis, le CH_3Hg^+ est synthétisé par des microorganismes anaérobiques et aérobiques. Cette espèce est soluble dans l'eau et peut former des composés tels que le CH_3HgCl , le CH_3HgOH et le CH_3HgSH . Ainsi, par son groupement méthyle, le CH_3Hg^+ a des affinités pour les lipides et par sa capacité à se lier avec des groupements sulfhydriles le CH_3Hg^+ se fixe fortement à la surface d'une membrane cellulaire d'un organisme. Ces caractéristiques sont idéales pour la bioaccumulation chez un organisme. La quantité de CH_3Hg^+ formée va dépendre des variables physico-chimiques. Toutefois, contrairement aux autres métaux traces, Ravichandran (2004) explique qu'une augmentation de la MOD stimule la prolifération des microorganismes, ce qui accroît la méthylation. Par conséquent, une augmentation de MOD augmente la biodisponibilité du méthylmercure.

Le mercure est particulièrement toxique puisqu'il s'insère dans la chaîne trophique et mène à une bioamplification. La chair des poissons exposée à ce contaminant contient des concentrations de 1 à 10 millions de fois plus élevées en mercure que leur milieu de vie (Olivier, 2002). Dans les rares cas de contamination extrême, les humains consommant ce poisson sont susceptibles de développer la maladie de Minamata, qui se traduit par un dérèglement sévère du système nerveux central pouvant causer la cécité, la paralysie ou même le décès (Olivier, 2002). Au niveau des plantes, la disponibilité du mercure est faible et le métal a tendance à s'accumuler dans les racines indiquant ainsi que les racines servent de barrière à la prise en charge du mercure. Pour les enzymes du sol, le mercure est en général un des métaux les plus toxiques étant donné la capacité du mercure à se lier fortement aux groupements

sulfhydrides. Notre intérêt pour ce métal provient de la toxicité du mercure pour les enzymes et les impacts potentiels sur le cycle des éléments nutritifs.

1.3.5 Le plomb

Comparé au mercure et au cadmium, le plomb se distingue par son abondance et sa grande dispersion. Cet élément non-essentiel fait partie du groupe IVB du tableau périodique, il peut former deux états d'oxydation soit le Pb^{2+} et le Pb^{4+} , mais dans l'environnement le Pb^{2+} domine. À l'état naturel, le Pb a de fortes affinités pour les sulfures et il se concentre dans un minerai nommé galène (PbS). Ce minerai a été fortement exploité avant que l'on observe ses effets néfastes. Il servait de matériau pour les toitures, la plomberie, les ustensiles de cuisine, les soudures des boîtes de conserve, les cartouches de chasse, les raticides ($\text{Pb}_3(\text{AsO}_4)_2$) et les antidétonants dans l'essence automobile ($\text{Pb}(\text{CH}_3)_4$ et $\text{Pb}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_4$). Aujourd'hui, le plomb est utilisé dans les accumulateurs automobiles ($\text{Pb}_{(s)}/\text{PbO}_2$), dans les batteries et pour isoler les chambres à rayons X. Les multiples utilisations du plomb ont occasionné des décharges importantes dans l'environnement et on en retrouve massivement près des autoroutes (ex : 978 mgPbkg^{-1}) et dans les milieux urbains (Markus et McBratney, 2001). Dans le sol, le Pb est peu soluble, Sauvé (2000) rapporte que seulement 1 à $<0.01\%$ du Pb total se retrouve en solution et 60 à $<1\%$ de ce Pb en solution se retrouve sous forme Pb^{2+} dépendamment du pH et des liaisons avec les ligands présents. Le plomb est fortement lié à la phase minérale, à la matière organique ou aux oxydes de Fe/Mn/Al. La solubilité est aussi réduite par l'ajout de phosphate (Sauvé, 1998) et la présence de sulfate ou de carbonate.

Au niveau de la toxicité, le Pb est un neurotoxique et les sujets exposés peuvent aussi souffrir d'anémie. Malgré le fait que cet élément soit peu mobile dans l'environnement et que ses effets se manifestent à des teneurs plus élevées que le mercure ou le cadmium, sa présence est préoccupante puisqu'il est très répandu dans l'environnement et que ses effets sont majeurs. Les plantes bioaccumulent le Pb sous la forme ionique métallique libre tout comme les microorganismes.

1.3.6 Le zinc

Le zinc est un élément trace essentiel au bon fonctionnement cellulaire des plantes et des animaux. La principale source de zinc dans la nature est la sphalérite ($(\text{ZnFe})\text{S}$), qui est souvent retrouvée avec la galène (PbS). L'exploitation du minerai sert principalement à produire du matériel galvanisé, des alliages de laiton et de bronze, des composantes de plomberie, des pigments et de l'engrais. L'oxyde de zinc est également employé dans la fabrication des pneus et des produits en caoutchouc (Environnement Canada, 1996b).

Malgré l'épandage important d'engrais, les sources anthropiques classiques sont responsables des dépositions dans l'environnement (mines, boues d'épuration...). Dans le sol, le zinc est relativement mobile et la présence de sulfates favorise la formation du complexe soluble ZnSO_4 . La présence de cette espèce influence la spéciation du zinc et augmente la biodisponibilité du Zn^{2+} (Kiekens, 1990; Lindsay, 1979). En milieu alcalin, les espèces ZnOH^+ et $\text{Zn}(\text{OH})_2$ deviennent majoritaires et le complexe chimique ZnHPO_4 devient significatif (Lindsay, 1979).

Une déficience en zinc entraîne des problèmes de croissance chez les plantes et les animaux. Une contamination en zinc entraîne aussi des problèmes de croissance mais également une diminution de la masse microbienne et une réduction de la fertilité des sols. La quantité de zinc présente dans un sol doit donc se situer dans une zone optimale. Au Québec, les sols contiennent naturellement entre 100 et 230 mg Zn kg^{-1} . Ces sols sont relativement riches en Zn comparativement à plusieurs sols dans le monde qui en sont déficients ($<10 \text{ mg Zn kg}^{-1}$).

1.4 Les biomarqueurs

Le concept de la fertilité d'un sol est utilisé pour décrire la capacité de production du sol, ce qui inclut l'aspect de la formation de la biomasse. Pour obtenir un sol fertile, il faut donc s'assurer que l'activité microbienne du sol ne soit pas perturbée par des intrants toxiques. La mesure de l'activité enzymatique est un bon indice puisque les

enzymes catalysent de nombreuses réactions biochimiques. Les enzymes ont par conséquent un rôle essentiel dans le maintien de la fertilité du sol et peuvent être considérées comme des indicateurs de la capacité métabolique du sol. Les enzymes sont également spécifiques aux réactions biochimiques auxquelles elles participent. L'analyse est simple, peu coûteuse, les méthodes sont bien développées, un nombre élevé d'échantillons peut être traité avec une petite quantité de sol et plusieurs enzymes sont très sensibles à la présence des métaux. Les métaux ont d'ailleurs fait l'objet de plusieurs études concernant leur capacité à inhiber l'activité enzymatique et Bååth (1989) a fait une bonne revue de la littérature. Ainsi, nous avons sélectionné la mesure de l'activité enzymatique, en tant que biomarqueur, selon ces critères. Plus particulièrement, nous avons choisi l'uréase puisque c'est une enzyme extracellulaire impliquée dans le cycle de l'azote et la déshydrogénase puisque c'est une enzyme intracellulaire favorisant les réactions d'oxydoréduction des composés organiques.

Les enzymes sont retrouvées dans les marais, les lacs, les animaux, le fumier et le sol. En fait, il y a des enzymes là où il y a de la vie. Les enzymes sont synthétisées par les cellules microbiennes, végétales et animales. Les microorganismes constituent toutefois la source la plus importante (Ladd, 1985). Les enzymes du sol peuvent être extracellulaires, c'est-à-dire excrétées par les organismes et elles peuvent être intracellulaires, c'est-à-dire comme partie intégrante de la biomasse (Tabatabai et Dick, 2002). Ce qu'on nomme mesure de l'activité enzymatique fait référence à la mesure de l'activité enzymatique extracellulaire, à l'exception de la déshydrogénase qui est uniquement intracellulaire (Skujins, 1978). Cette définition signifie qu'on veut mesurer, dans le sol, les enzymes actives et sans prolifération microbienne (Ladd, 1978). Les enzymes extracellulaires sont retrouvées sous formes libres dans le sol ou immobilisées et stabilisées par un réseau macromoléculaire en trois dimensions. Les mécanismes dominants sont la microencapsulation, l'adsorption, l'inclusion, l'échange ionique, la réticulation et l'attachement par liaison covalente (Tabatabai et Dick, 2002). L'immobilisation protège les enzymes contre la dégradation et la dénaturation. Le terme immobilisé est utilisé pour définir les enzymes actives liées aux argiles et aux molécules humiques (Nannipieri et Landi, 2000). Ainsi, les

enzymes immobilisées et stabilisées peuvent s'accumuler dans le sol. La Figure 4 illustre un résumé de l'activité enzymatique dans le sol. Les enzymes peuvent être intracellulaires dans les cellules vivantes, dormantes ou dans les débris cellulaires. Les enzymes peuvent être aussi présentes à l'extérieur de la cellule sous formes libres ou immobilisées.

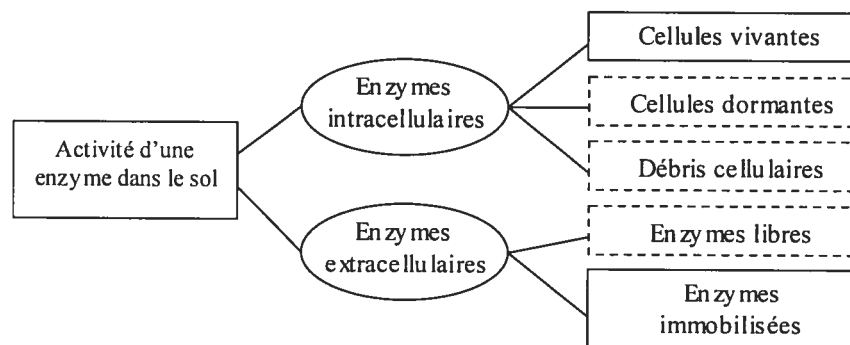


Figure 4. Représentation de l'activité enzymatique dans le sol. La contribution des enzymes entourées de lignes pointillées est généralement négligeable. Figure adaptée de Nannipieri et Landi (2000).

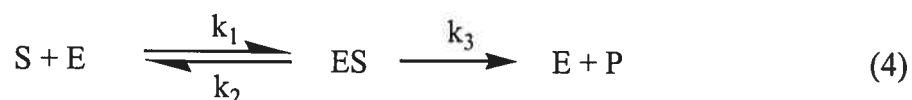
Origine	Enzymes extracellulaires				Enzymes intracellulaires	
	Enzymes accumulées			Enzymes libérées continuellement		Provenant de la prolifération des cellules des microorganismes, des plantes et de la faune du sol
	Complexées avec les composantes cellulaires	Non complexées avec les composantes cellulaires		Provenant des microorganismes	Provenant des racines des plantes	
		Provenant des microorganismes et de la faune du sol : - Enzymes intracellulaires provenant de cellules rompues - Enzymes extracellulaires	Provenant des racines des plantes			
Endroit dans le sol	<div>Cellules mortes intactes</div> <div>Cellules sans prolifération</div> <div>Fragments cellulaires</div>	<div>Dans la phase liquide</div> <div>Complexées aux composantes du sol</div>				<div>Dans les organismes</div>

Figure 5. Composantes de l'activité enzymatique du sol. Figure adaptée avec modification de Skujins (1978).

Skujins (1978) a également représenté l'activité enzymatique d'un sol mais il a en plus intégré l'origine des enzymes tel qu'illustré à la figure 5.

Les enzymes catalysent la synthèse de protéines, de glucides, d'acides nucléiques et d'autres composantes des systèmes vivants. Elles catalysent également la dégradation de la matière organique et les réactions dans les cycles du carbone, de l'azote, du phosphore, du soufre et d'autres nutriments. Les principales catégories d'enzymes sont les oxydoréductases (ex : déshydrogénases, catalases, peroxydases, phénol oxydases et glucose oxydases), hydrolases (ex : cellulases, protéases, uréases, β -galactosidases, xylanases, nucléases et phosphatases), transférases, lyases, isomérases et invertases (Rossel et al., 1997).

Selon la théorie de Michaelis et Menten, les enzymes (E) forme un complexe (ES) avec un substrat (S) tel qu'indiqué dans l'équation (4).



Ce complexe (ES) est instable et de nombreux réarrangements ont lieu avant la formation du produit (P) et de l'enzyme (E) originale (Tabatabai, 1994). Dans l'équation (4), k_1 , k_2 et k_3 représentent les constantes de vitesse. Plusieurs facteurs affectent les constantes de vitesse de ces enzymes. Tabatabai (1994) rapporte que l'amendement des sols, les facteurs environnementaux, le type de végétation, les produits chimiques agricoles et les polluants industriels modifient le degré d'activité. Tabatabai indique également que les changements physico-chimiques tels que le pH, la force ionique et la température influencent considérablement l'activité enzymatique. En effet, une modification de pH entraîne des changements d'ionisation et de solubilité de l'enzyme. Toutes ces variations modifient la vitesse de la réaction catalytique.

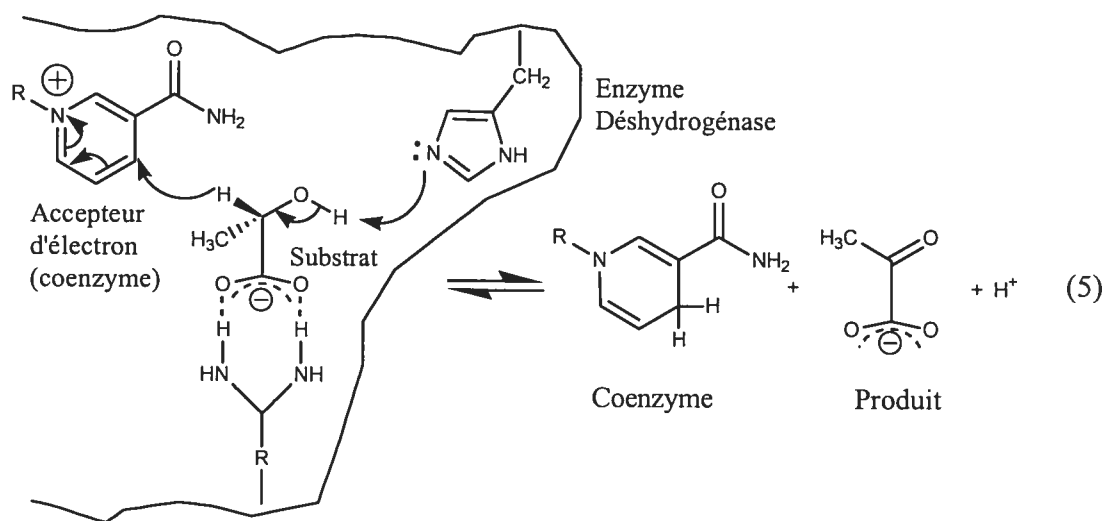
Quant aux polluants, Rossel (1997) décrit quelques modes d'action écotoxique qui peuvent affecter l'activité enzymatique du sol par des effets directs et indirects comme un impact sur :

- L'activité des enzymes produites
- La biosynthèse des enzymes microbiennes
- La composition de la microflore du sol (augmentation/diminution de la production d'enzymes extracellulaires provenant des groupes microbiens)
- Le système plante/racine (production d'exsudats de racines et lixiviation des enzymes provenant des racines mortes)

Les polluants peuvent également modifier le pH et les cinétiques de biodégradation.

1.4.1 La déshydrogénase

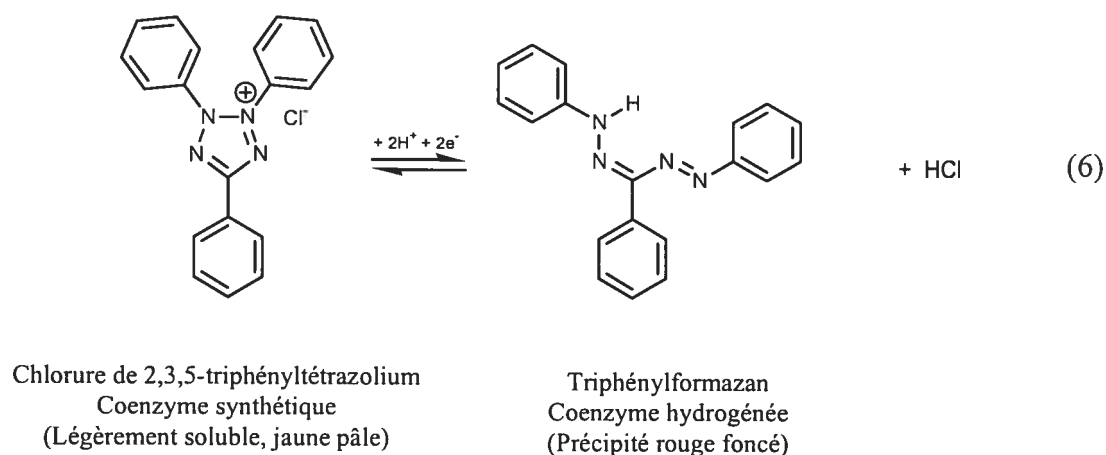
Les enzymes déshydrogénases sont présentes et actives dans tous les organismes vivants. Ces oxydoréductases intracellulaires catalysent les réactions d'oxydoréduction des composés organiques par un transfert d'une paire d'électrons. Un exemple du mécanisme de la réaction est décrit à l'équation (5).



Dans cette réaction, la déshydrogénase déprotonne un substrat et forme des liaisons hydrogène qui stabilisent la molécule pendant la réaction (Moran et al., 1994). Ensuite, le substrat transfère un proton vers un accepteur d'électrons, un coenzyme,

ce qui déclenche le transfert d'une paire d'électrons. Finalement, l'enzyme libère le proton et retrouve sa forme originale après avoir catalysé l'oxydation du substrat en produit.

Il existe plusieurs types de déshydrogénases. Dans les sols, on mesure l'activité moyenne de la population des déshydrogénases. La première méthode analytique à cet effet a été développée par Lenhard (1956). Dans cette méthode, le chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (TTC) est réduit en triphénylformazan (TPF). Cette méthode a par la suite reçue beaucoup d'attention dans la littérature puisqu'elle est très sensible à la présence des métaux et qu'elle est plus sélective par le fait qu'elle est intracellulaire. Celle que nous avons retenue est une dérivée proposée par Tabatabai (1994).

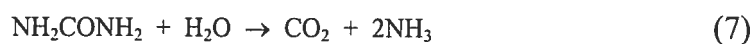


La méthode consiste à utiliser le TTC, un sel tétrazolium suffisamment soluble pour réagir en solution aqueuse. Ce composé jaune pâle est utilisé à titre de coenzyme synthétique pour accepter des électrons provenant d'un substrat de la respiration microbienne (Pepper et al., 1995). Le TTC est réduit en TPF, tel qu'indiqué dans l'équation (6), pour former un précipité rouge foncé insoluble dans l'eau. Ce précipité rouge est extrait par un solvant organique, le méthanol, et l'extrait est finalement dosé par spectrophotométrie UV-visible.

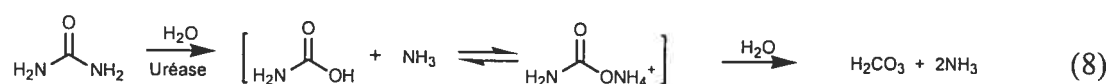
Plusieurs facteurs doivent être contrôlés dans la mesure de l'activité de la déshydrogénase. Parmi les paramètres, le pH, l'amendement avec des nutriments et la capacité d'échange cationique (CEC) sont des facteurs déterminants sur la réponse enzymatique (Rossel et al., 1997). En effet, un pH supérieur à 10 entraîne une augmentation de la concentration en TPF. Ensuite, si le sol est amendé, la population microbienne sera plus importante et la réponse enzymatique sera par conséquent supérieure. Quant à la CEC, une fraction plus ou moins grande du sel tétrazolium sera adsorbé sur la matrice du sol et ne sera pas disponible pour la microflore pendant l'incubation. Chander et Brookes (1991) ont pour leur part démontré que le cuivre occasionnait une interférence importante à l'activité de la déshydrogénase.

1.4.2 L'uréase

L'uréase est une hydrolase qui catalyse l'hydrolyse de l'urée en dioxyde de carbone et en ammoniac :



Elle catalyse également l'hydrolyse des hydroxyurée, dihydroxyurée et semicarbazide (Alef et Nannipieri, 1995). Cette enzyme est présente dans les plantes et les microorganismes (particulièrement les bactéries). Sa présence dans le sol a été rapportée pour la première fois par Rotini (1935). L'uréase a une masse moléculaire allant de 151 000 à 480 000 Da, elle contient du nickel et pour l'enzyme de 480 000 Da environ 47 groupes sulfhydryles sont dénombrés (Bremner et Mulvaney, 1978). L'uréase agit sur les liaisons non-peptidiques C-N dans les amides linéaires. Le mécanisme de réaction implique la formation d'un carbamate comme produit intermédiaire. La réaction a été résumé par Reithel (1971) et Tabatabai (1994) selon l'équation suivante :



Plusieurs méthodes ont été proposées pour mesurer l'activité de l'uréase (Bremner et Mulvaney, 1978; Kandeler et Gerber, 1988; Tabatabai 1994; Alef et Nannipieri, 1995). Cette enzyme a reçu beaucoup d'attention puisque l'urée est un des engrais les plus important au monde. Du point de vue des agriculteurs, la rapidité de l'hydrolyse de l'urée dans le sol est problématique. Beaucoup d'études ont été menées pour trouver un inhibiteur pour l'enzyme (McCarty et al., 1989). Ces recherches ont donc été utiles pour valider l'utilisation de l'uréase en tant qu'essai enzymatique. La méthode que nous avons retenue est celle proposée par Kandeler et Gerber (1988). Elle consiste à incuber une solution d'urée pendant 2 heures. Suite à cette incubation, l'urée est convertie en ammonium. L'ammonium est extrait avec une solution de chlorure de potassium et l'extrait est dosé par spectrophotométrie UV-visible. Nous avons choisi cette méthode puisqu'elle est simple et qu'elle ne nécessite pas l'utilisation d'un tampon. Nous ne voulions pas introduire de tampon dans nos échantillons puisque les études de spéciation auraient été compromises. De plus, l'activité de l'uréase est peu influencée par les valeurs de pH de nos sols (Frankenberger et Johanson, 1982).

1.5 Évaluation des effets des métaux individuels

Les effets d'un composé toxique pour un organisme sont reliés directement avec la dose à laquelle il est exposé. Cette relation se traduit graphiquement par une courbe sigmoïdale nommée courbe dose-réponse (Figure 6). Le haut de la Figure 6 représente la fréquence de mortalité pour un organisme X et le bas de la figure illustre la courbe dose-réponse. Cette figure signifie qu'à faible dose seulement les organismes les plus sensibles aux polluants meurent et à fortes doses ce sont les organismes les plus résistants. Normalement, les résultats de toxicité sont exprimés en fonction de la dose létale 50 (LD_{50}). C'est-à-dire que la toxicité du polluant occasionne la mort chez 50 % des sujets. Le terme dose effective (ED_{50}) est aussi fréquemment employé et il s'agit d'une mesure des effets du polluant pour 50 % de la population (Crosby, 1998).

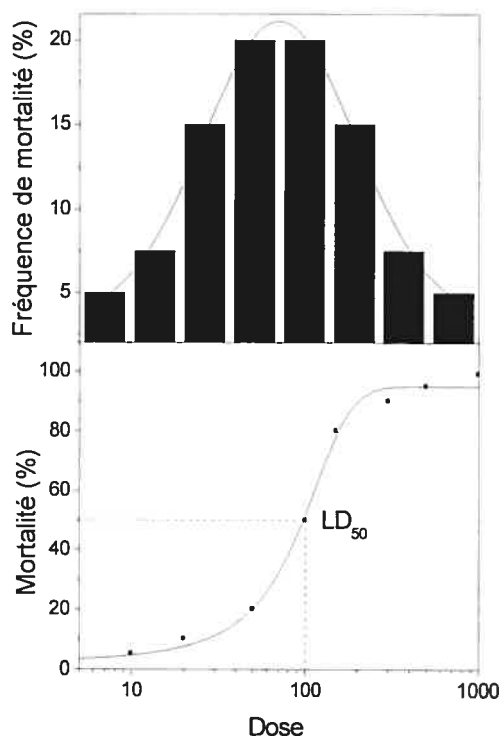


Figure 6. Relation dose-réponse.

Pour obtenir la courbe dose-réponse, différents modèles de régression non-linéaire ont été proposés (Scholze et al., 2001). Nous avons retenu le modèle logistique classique puisqu'il est représentatif et simple. Ce modèle est basé sur l'application de l'équation à trois paramètres suivante :

$$E = \frac{E_{CON}}{1 + \exp \{ m (\log (D) - \log (EC_{50})) \}} \quad (9)$$

Dans l'équation (9), E est une mesure de la réponse de l'activité enzymatique, E_{CON} est la réponse des enzymes correspondant au contrôle, m représente la pente de la courbe dose-réponse à 50 % d'effet, D correspond à la dose appliquée et EC_{50} indique la concentration qui cause 50 % d'inhibition de l'activité enzymatique.

Dans certaines situations, nos résultats ne corrôlaient pas avec la courbe dose-réponse classique. Nous avons plutôt observé une réponse hormétique (Figure 7). L'hormésis

survient quand le composé toxique provoque une stimulation de l'activité enzymatique à faible dose (Calabrese et Baldwin, 2003).

Cette relation peut être traduite par une modification du modèle logistique. Brain et Cousens (1989) ont développé l'équation suivante pour représenter les effets d'hormésis :

$$E = \frac{E_{CON} + f(D)}{1 + \exp \{ m (\log (D) - \log (EC_{50})) \}} \quad (10)$$

Dans l'équation (10), $f(D)$ est un paramètre qui mesure le taux initial d'augmentation de la réponse enzymatique, c'est-à-dire le degré de stimulation engendré par le polluant. Tous les autres paramètres conservent la même signification que l'équation (9).

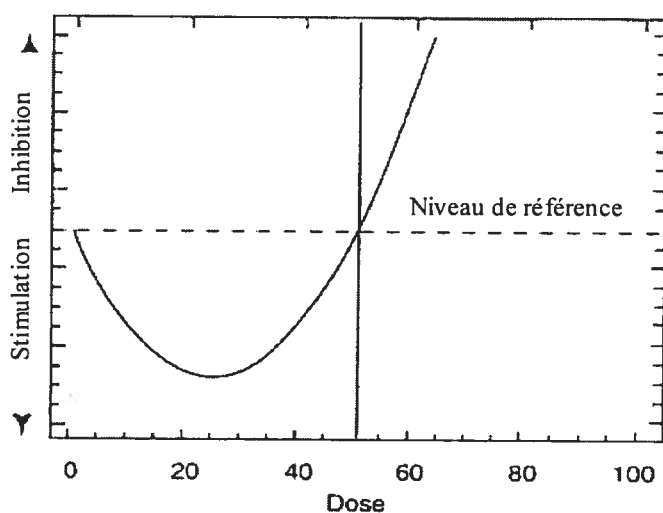


Figure 7. Relation dose-réponse en présence d'hormésis.

1.6 Étude des effets des mélanges

Les organismes vivants sont exposés à une multitude de composés toxiques. Toutefois, la plupart des études portent sur la toxicité des polluants seuls puisque c'est plus simple et moins dispendieux. Néanmoins, en pharmacologie on remarque un intérêt croissant pour la toxicité des mélanges, étant donné l'observation de nombreuses interactions entre les médicaments. Berenbaum (1989), Greco (1995) et Cassee (1998) ont d'ailleurs fait de bonnes revues de la littérature. Les modèles développés dans ce champ d'étude sont de plus en plus appliqués en environnement. Norwood (2003) a d'ailleurs effectué une revue de la littérature concernant les mélanges de métaux dans le milieu aquatique. Les résultats pour les organismes du sol montrent, quant à eux, l'importance d'investir dans les études de toxicité des mélanges (Preston et al., 2000; Jonker et al., 2004). En effet, certaines études rapportent des effets synergiques, d'autres des effets additifs ou encore antagonistes. En plus, plusieurs auteurs utilisent différents termes pour exprimer les effets observés.

L'idée à la base des études en toxicologie des mélanges est de comparer les effets observés dans la combinaison à ceux prédits à partir des métaux individuels. Ainsi, si des effets plus toxiques que la prédiction sont observés dans le mélange, le terme effet synergique devrait être employé. À l'inverse, si des effets moins toxiques que la prédiction sont observés, le terme effet antagoniste devrait être utilisé. Dans le cas où le mélange démontre des effets similaires à la prédiction, le terme effet additif devrait être utilisé. Une méthode intuitive pour prédire les effets du mélange consiste à additionner les effets pour une dose donnée de chaque composé individuel (ex : $E_{A+B} = E_A + E_B$). Toutefois, une grande incohérence découle de cette méthode (Kortenkamp et Altenburger, 1999). Dans la Figure 8, 0,1mM d'un composé A et B engendrent chacun un effet individuel de 64 sur un organisme X. La prédiction de l'effet du mélange est donc $64 + 64 = 128$ et supposons que l'effet observé pour la combinaison soit 167. Dans ce cas-ci, un cas de synergie pourrait être déduit. Or, 0,2mM de A ou B donne déjà 167, soit un effet supérieur à la prédiction. Une autre

incohérence dans ce modèle se situe dans la somme de deux composés ayant chacun des effets de 60 %. Cette somme donne un résultat aberrant de 120 %.

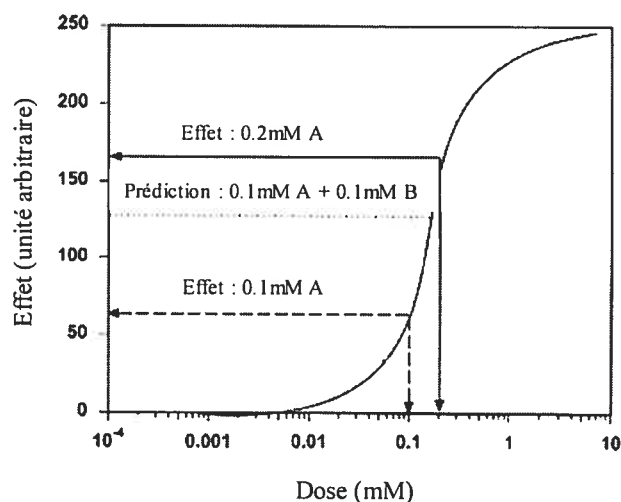


Figure 8. Courbe dose-réponse hypothétique démontrant l'incohérence d'un simple modèle additif pour prédire la toxicité de la combinaison de A et B. Figure adaptée de Kortenkamp (1999).

1.6.1 Terminologie

Un problème majeur concernant les effets des agents combinés est le manque de cohérence dans les définitions des termes d'interaction. Pour décrire une situation *sans interaction*, les termes tels que addition de la dose, action similaire simple, addition de la réponse, action indépendante et zéro interaction peuvent être employés. Pour décrire une situation où l'effet est plus grand que le cas *sans interaction*, les termes comme synergique, potentialisation et supra-additivité peuvent être employés. Tandis que les termes antagoniste, inhibition, sub- et infra-additivité peuvent être utilisés pour indiquer un effet plus petit que le cas *sans interaction*. Plusieurs termes sont utilisés pour décrire les mêmes phénomènes et le même terme a souvent une signification différente pour différents auteurs (Kodell et Pounds, 1991). Néanmoins, Placket et Hewlett (1952) ont défini quatre types d'actions conjuguées et il y a une tendance à rapporter les résultats selon ces catégories. Dans le Tableau II, deux grandes catégories sont présentées soit les actions interactive et non-interactive.

Tableau II. Action conjuguée des mélanges

Action	Similaire	Dissimilaire
Non-interactive	Action simple similaire	Action indépendante
Interactive	Action complexe similaire	Action dépendante

Pour les actions non-interactives, les termes action simple similaire et action indépendante sont définis. Ces termes sont synonymes à l'addition de la dose et à l'addition de la réponse respectivement. La deuxième catégorie fait référence aux actions interactives. Dans ce cas-ci la toxicité ne peut pas être prédite puisque les substances ont des effets interdépendants. Les actions conjuguées interactives font alors références aux effets synergique et antagoniste. Plackett et Hewlett sont parvenus à structurer l'action des mélanges, mais dans bien des cas il y a un manque d'information pour spécifier l'approche à utiliser. Berenbaum (1989) propose par conséquent trois classes simples : zéro interaction, synergisme et antagonisme. Malgré la simplicité de cette proposition, une question se pose quant à la définition du terme de référence *zéro interaction*. Généralement, les modèles où il y a *zéro interaction* sont basés sur l'addition de la dose et l'addition de la réponse (Kodell et Pounds, 1991; Greco et al., 1995; Groten et al., 2001). Les instigateurs de ces modèles sont Loewe (1926) et Bliss (1939) respectivement. Ainsi, le plus grand consensus répertorié par Greco (1995) et Groten (2001) fait référence à l'utilisation des termes cités dans le Tableau III. Par conséquent, nous utiliserons ces termes le cas échéant où l'addition de Loewe fait référence à l'addition de la dose et l'indépendance de Bliss fait référence à l'addition de la réponse.

Tableau III. Consensus sur la terminologie d'agents combinés

Nature de l'effet	Action conjuguée	
Effet du mélange > prédiction	Synergisme de Loewe	Synergisme de Bliss
Effet du mélange = prédiction du modèle de référence	Addition de Loewe	Indépendance de Bliss
Effet du mélange < prédiction	Antagonisme de Loewe	Antagonisme de Bliss

1.6.2 Indépendance de Bliss

L'indépendance de Bliss assume que les composés du mélange ont un mécanisme d'action complètement différent et/ou indépendant l'un de l'autre. Dans ce cas, les composés du mélange n'affectent pas la toxicité de l'un et l'autre. L'indépendance de Bliss est mesurée seulement si le seuil de tolérance de chacun des composés est dépassé. Ce qui signifie que chaque composé individuel doit démontrer un effet sur l'organisme pour qu'une addition de la réponse soit mesurée (Könemann et Pieters, 1996). L'indépendance de Bliss (1939) est exprimée par l'équation (11) suivante :

$$fu_{12} = fu_1 \cdot fu_2 \quad (11)$$

où fu_1 , fu_2 et fu_{12} représentent respectivement les fractions des organismes non affectées pour les composés 1, 2 et la combinaison. À titre d'exemple, si 60% des organismes survivent à l'exposition du métal 1 et 40% des organismes survivent à l'exposition du métal 2, la combinaison des deux métaux devrait égaler $0,6 \times 0,4 = 24\%$. C'est-à-dire que seulement 24% des organismes survivront après la combinaison des métaux. L'équation (11) est aussi souvent traduite dans la littérature en terme d'effet et elle est représentée par l'équation (12) :

$$p_{12} = p_1 + p_2 - p_1 p_2 \quad (12)$$

où p_1 , p_2 et p_{12} représentent les fractions des organismes affectées par les composés 1, 2 et la combinaison. Cette définition signifie que les organismes sont affectés autant par le composé 1 que par le composé 2 (Musch, 1996).

1.6.3 Addition de Loewe

La théorie à la base de l'addition de Loewe suppose que les composés du mélange ont le même mécanisme d'action et agissent sur le même récepteur biologique. Les composés du mélange n'affectent pas la toxicité de l'un et l'autre et un composé ne peut interagir avec lui-même. Les composés du mélange contribuent aux effets de la

toxicité en proportion de la dose de chaque composé. Dans ce modèle, il n'existe pas de seuil de tolérance. C'est-à-dire qu'à une concentration où il n'y a aucun effet pour chacun des composés individuels, il peut tout de même y avoir un effet observé avec la combinaison de ces composés. La formule utilisée pour l'addition de Loewe est représentée par l'équation (13) :

$$1 = \sum \frac{D_i}{EC_{y,i}} \quad (13)$$

où D_i est la dose du composé i dans le mélange donnant un taux d'inhibition $y\%$. $EC_{y,i}$ = concentration du polluant i seul donnant $y\%$ d'inhibition. Cette équation est largement utilisée en toxicologie aquatique des mélanges et elle est nommée : Approche par unité toxique (Sprague, 1970). Une réponse supérieure à 1 indique des effets antagonistes et une réponse inférieure à 1 indique des effets synergiques. Cette approche a toutefois les inconvénients de nécessiter une grande quantité de points et d'être valide pour un seul taux d'inhibition. Greco (1995) a développé une équation consistante avec l'équation (13) mais sa méthode est plus pratique d'application et permet de travailler à tous les niveaux d'inhibition. L'équation (14) représente la formule :

$$1 = \sum \frac{D_i}{EC_{50,i} \left(\frac{E}{E_{con} - E} \right)^{1/m_i}} \quad (14)$$

où D_i = dose du polluant i dans le mélange, $EC_{50,i}$ = concentration du polluant i seul donnant 50% d'inhibition, E = mesure de la réponse de l'activité enzymatique dans le mélange, E_{con} = réponse de l'activité enzymatique du contrôle, m_i est le paramètre de la pente pour le polluant i .

Une déviation de la prédiction de ce modèle est considérée significative quand la valeur prédite est à l'extérieur de l'intervalle de confiance (95%) de la valeur moyenne observée.

1.6.4 Choix du modèle

La difficulté fondamentale est de savoir lequel des modèles *sans interaction* nous devons appliquer. En effet, il est rare que nous puissions obtenir les données concernant les mécanismes d'action des différents composés toxiques sur la cible biologique. Une des méthodes possibles est d'établir les courbes dose-réponses des composés individuels et de comparer le parallélisme des pentes (Van Gestel et al., 1997; Sharma et al., 1999; Altenburger et al., 2005). Si les droites sont parallèles statistiquement, les composés sont jugés similaires et le modèle de l'addition de Loewe est appliqué. Toutefois, dans la littérature, il est reconnu que les pentes n'ont pas besoin d'être identiques pour que l'addition de Loewe soit appliquée. Greco (1995) montrent en effet que l'équation (13) n'est pas si restrictive et qu'il n'est pas nécessaire que les composés aient un mode d'action identique pour que l'addition de Loewe soit valide. Hermens et Leeuwangh (1982), Deneer et al. (1988) et Altenburger et al. (1996) ont également montré que de bonnes prédictions pouvaient être obtenues en présence de composés toxiques avec des modes d'action différents en utilisant le modèle de l'addition de Loewe. À l'opposé, Sharma et al. (1999) ont rapporté que les métaux traces ont des préférences sélectives pour former des liens de coordination avec des sulfures, de l'oxygène ou de l'azote. Cette observation suppose que les métaux ont plutôt des modes d'action différents sur une cible biologique et l'étude montre que le modèle de l'indépendance de Bliss est plus représentatif des données observées. Faust et al. (2003) ont démontré pour leur part que de meilleures prédictions pouvaient être obtenues avec le modèle de l'indépendance de Bliss par rapport au modèle de l'addition de Loewe pour des substances avec des mécanismes différents. Ainsi, la confusion règne dans la littérature quant au choix du modèle de référence. Par conséquent, nous avons décidé de vérifier les deux modèles.

2 TOXICITÉ DES MÉTAUX COMBINÉS (Cd, Cu, Pb) SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

2.1 Avant-propos

L'étude présentée concerne la toxicité des métaux tels que le Cd, le Cu, et le Pb sur l'activité enzymatique d'un sol. La toxicité des métaux individuels et en combinaison a été étudiée avec les enzymes déshydrogénase et uréase. Le sol a été contaminé avec une combinaison factorielle de métaux et ce dernier a été équilibré pendant une période d'au moins cinq ans avant les analyses. La spéciation des métaux a été réalisée en parallèle afin de considérer les effets de la chimie du sol dans l'étude. Les résultats montrent qu'une plus faible activité de Cu^{2+} libre et de Pb^{2+} libre a été mesurée dans les mélanges binaires. Par conséquent, nous avons observé une stimulation de l'activité enzymatique. La toxicité du mélange de métaux a été prédite selon les modèles de l'indépendance de Bliss et de l'addition de Loewe. Des effets antagonistes des mélanges ont été observés avec les deux modèles et pour les deux enzymes étudiées. Toutefois, les résultats obtenus avec le modèle de l'indépendance de Bliss étaient plus près des valeurs observées. De plus, nous avons obtenu des pentes hétérogènes pour les courbes dose-réponses des métaux. Ainsi, selon nos résultats, le modèle de l'indépendance de Bliss semble plus approprié pour prédire la toxicité des mélanges.

TOXICITY INTERACTION OF CADMIUM, COPPER AND LEAD ON SOIL
UREASE AND DEHYDROGENASE IN RELATION TO
CHEMICAL SPECIATION

(Submitted to Environmental Toxicology and Chemistry)

Sophie Chaperon and Sébastien Sauvé*

Department of Chemistry, Université de Montréal, P.O. Box 6128 Centre-Ville, Montreal, QC, Canada, H3C 3J7

2.2 Abstract

The toxicity of the trace metals Cd, Cu and Pb alone and in combination was assessed to the soil enzymes dehydrogenase and urease. We assayed the enzymatic response of a forest soil exposed to single metals and metal mixtures in a factorial design. The speciation of the metals was measured concurrently in order to consider the effect of soil chemistry on the enzyme activities. The toxicity interaction of the metal mixtures was predicted according to the classical Bliss independence and Loewe additivity models. Significant antagonistic effects were observed for the majority of the combinations for both the dehydrogenase and the urease assays. Moreover, the results suggest that the Bliss independence model may be appropriate to predict metal mixture toxicity which would tend to suggest different, rather than similar, modes of action. Furthermore, for a given total metal concentration we measured the single metal activities for each of the following ions: Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} . Then, with the same total metal concentrations, we did binary mixtures and we measured a lower free copper and lead activity but a higher free cadmium activity in comparison to the single metal activities. As a result, a stimulation of enzymatic activities was observed in the mixtures in comparison to the enzymatic activities obtained with the individual metals.

Keywords: Trace metals; Mixture toxicity; Speciation; Enzyme assay; Joint action models

2.3 Introduction

Soil quality criteria for contaminated sites are presently based on the observed toxicity from single pollutants. However, most contaminated soils are exposed to various chemicals simultaneously. Few data have been published on the toxicity of pollutant mixtures in soils. Furthermore, many of those studies focus on the toxicity of organic contaminants. The toxicity of trace element mixtures, particularly in relation to microbial activity, has received much less attention. The few results available in soils, show that additive, synergistic or antagonistic effects can all be expected [1-3]. The term additive effect, is also sometimes referred to as dose additivity (Loewe additivity, concentration additivity and Toxic Unit approach) and response additivity (Bliss independence). These terms are used to describe a “no interaction action” or a zero interaction between components. A toxicity greater than additive is described as a synergistic effect, while terms such as antagonistic or inhibition effects are commonly used to describe a toxicity lower than the additive effect.

A plethora of models were developed to predict the toxicity of metal mixtures. However, the majority of these models refer to the basic concepts of Loewe additivity and Bliss independence [4-5]. Loewe additivity considers that a toxicant cannot interact with itself and that each toxicant in the mixtures acts in the same way, by the same mechanisms and reaches the same biological target. On the other hand, Bliss independence (response additivity) is based on the assumption that the mode of action and possibly, but not necessarily, the nature and the site of the effect differ among the toxicants in the mixtures. Thus, a fundamental difficulty is to choose between these noninteractive models without having enough information on the mechanistic action of trace metals. Greco et al. [6] and Berenbaum [7] have proposed the Loewe additivity model as a reference model and a “general solution” for analyzing interactions between components, irrespective of their mechanisms of action or the nature of their dose-response relationships. Hermens et al. [8], Deneer et al. [9] and Altenburger et al. [10] have shown for their part that reasonable predictions could be

obtained with the Loewe additivity model with components having different modes of action or unknown modes of action. Sharma et al. [3] suggested that heavy metal ions exhibit a broad variation in their relative preferences for sulfur-, oxygen-, or nitrogen-based coordination, which suggests different, rather than similar, modes of action. Therefore they suggested that the Bliss independence model describes more accurately the toxicity of trace metal mixtures. Faust et al. [11] have demonstrated that substances with strictly different mechanisms of action are better predicted with the Bliss independence model than with the Loewe additivity model. Thus, it is not clear which toxicity interaction calculation model is most appropriate; this is probably partly due to the scarcity of studies in this field. Therefore, we decided to predict our results using both the Loewe additivity and the Bliss independence model, as illustrated by Grote et al. [12]. As we have seen in the literature, we suggest the possibility that the measured mixture responses will be higher (less toxic) than the additive prediction. We also predict that the Bliss independence model will be closer to our results because we think that different metals will have different mode of actions.

In addition, the reported studies focus on the total elemental content of soils, with little or no consideration for chemical speciation and bioavailability [2]. There is, however, a consensus for the importance to consider bioavailability and metal speciation in trace metal toxicity studies. Metal speciation will also be affected by a variety of physicochemical parameters, such as pH, organic matter and clay content, which all have an impact on the bioavailability and the toxicity potential of metals. There is also evidence, as reviewed by Nolan et al. [13] and Sauvé [14], that soil solution free-metal activities are often better predictors of toxic effects than soil total measurements.

The aim of this study was to better understand mixture toxicities encountered in soils with a special attention to the bioavailability of metals. For this purpose, we have established the dose-response curve of each metal alone (Cd, Cu, Pb) using their free-metal activities. Then we have predicted the toxicity of their mixtures using the

Loewe additivity and the Bliss independence models. The predicted and observed data were compared to determine whether there is an additive, synergistic or antagonistic interaction in the metal combinations. We measured the effect of metals on two enzymes: urease and dehydrogenase. We have chosen enzymatic assays because they are representative of the metabolic capacity of the soil, sensitive, rapid and inexpensive. We have chosen urease because it is an extracellular enzyme implied in the nitrogen cycle and dehydrogenase because it is an intracellular enzyme catalyzing oxydoreduction reaction of organic compounds.

2.4 Material & Methods

Soil samples

A forest soil from the surface (0-20 cm) layer was collected at the Macdonald Campus of McGill University (Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada) and sieved moist to < 6mm. In 1997, moist soil samples were spiked with CdCl_2 (1, 10, 20 and 50 mg Cd kg^{-1} dry soil), PbCl_2 (100, 500, 1,000 and 2,000 mg Pb kg^{-1} dry soil) and CuCl_2 (50, 250, 500 and 1,000 mg Cu kg^{-1} dry soil). The choice of the concentrations were based on the soil quality criteria of the Canadian Environmental Quality Guidelines [15]. Distilled-deionized water was added and the spiked soils were then shaken by hand every other day for a month. The containers were kept loosely covered. After this time, evaporation reduced the water content of the soils to about 20% and the soils were then stored moist to allow complete reaction and stabilization of metals. In 1998, soils were also similarly contaminated using a factorial set up that combined selected concentrations of each metal. The metals added to the soils were therefore subjected to an equilibration period of ≥ 5 years.

The soil used, which is a *Melanic Brunisol*, has the following particle size distribution: sand (53-2,000 μm) 57%, silt (2-53 μm) 38%, clay (<2 μm) 5%. The total organic content is 54.6 g C kg^{-1} by redox titration [16], the cation exchange capacity is 14 $\text{cmol}_\text{c} \text{kg}^{-1}$ by BaCl_2 displacement [17] and the pH_{KNO_3} is 5.74.

Chemical analysis

Soil solutions were obtained by an addition of 20 mL of 0.01M KNO₃ (ultra pure grade) to 10 g of soil in 50-mL centrifuge tubes. The tubes were shaken 16 hours on a reciprocal shaker and centrifuged at 5,000 g for 15 min to separate the supernatants. The pH was measured using a Radiometer Analytical PHM250 meter and a Fisher Accufast combined electrode. The electrolytic conductivity was measured using a Radiometer Analytical CDM 210 instrument. The solutions were then filtered through 0.45- μ m cellulosic membranes and the anions were determined by ion chromatography with an IC-Pak A column and a conductivity detector (430 from Waters, USA). The extracts were then preserved with 2-5% HNO₃ until total dissolved metals were analyzed by ICP-AES (Iris advantage/1000 from Jarrell Ash corporation, U.S.A) and ICP-MS (Ultramass 700 from Varian, Australia). The activity of Cu²⁺ was obtained by ion-selective electrode measurements with a Radiometer Analytical TitrLab TIM865 Manager meter and a detectIon 2271011 electrode using IDA-Buffers to calibrate the electrode [18]. The activities of Cd²⁺ and Pb²⁺ were determined from the differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) measurements of ASV-labile Cd and Pb [19-20]. These data were obtained with a PTS050 polarograph from Radiometer Analytical with a hanging mercury drop electrode module (MDE 150). The samples were pre-purged for 5 min with N_{2(g)} to remove dissolved oxygen. A -0.7 V potential was used for the electrodeposition step of 45 s (with stirring) followed by 15 s homogenization period (without stirring). The potential of the electrode was then decreased linearly to a value of -0.3 V for the metal stripping step.

Total soil metals were determined using a 1-h reflux digestion of ~0.5 g of powdered soil in 10 mL of concentrated HNO₃. Digests were made up to 50 mL and analyzed by furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) with a Varian SpectrAA instrument equipped with Zeeman background correction.

Bioassays

The results of both dehydrogenase and urease were normalized, i.e., we used a sample of 600 mg Ag kg⁻¹ as Ag₂SO₄ to act as a biocide on both dehydrogenase and urease, then we subtract the result from every enzymatic responses of our soil samples. The data were reported in term of % response. Each sample was analyzed in 4 replicates and controls and blanks were added with each batch. For both methods, no pH buffers were added in order to minimize effects upon the speciation and to measure the response as it occurs in the soil [21]. Given that the assay was all done on the same soil, any methodological bias is nearly identical across treatments.

Urease activity in soils was assessed as the capacity of the enzyme to catalyze the transformation of urea into ammonium [22]. The non-buffered method was used. This method involves the incubation of the soils with added urea for 2 h at 37°C. The released ammonium is extracted with a potassium chloride solution, and the resulting suspensions were filtrated (Fisherbrand Q8 paper filter). The filtrates were analyzed by a modified Berthelot reaction, in which a reaction of sodium salicylate with NH₃ in presence of sodium dichloroisocyanurate takes place to form a green-colored complex. A calibration curve was done using 4 standards (1, 1.5, 2, 2.5 µg NH₄-N mL⁻¹). The green-colored complexes were quantified with a CECIL Instruments CE4002 spectrophotometer at λ=690 nm after a 30-min color development period.

The dehydrogenase activity analysis, involves the measure of triphenyl formazan (TPF) produced from the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC) [23]. Samples of 5 g of air-dried soil were placed in 50-mL centrifuge tubes. To each tube, 1 mL of 3% TTC and 5 mL of deionized water were added. Then the samples were mixed on a vortex, the tubes were closed and incubated in the dark for 24 h at 37°C. After the incubation, 10 mL of methanol were added, the samples were shaken and filtered (Fisherbrand Q8 paper filter). An additional 10 mL of methanol was added to wash the tubes, then filtered. For calibration, 7 standards of TPF were prepared (0.5, 1, 3, 5, 7, 10 and 15 µg of TPF mL⁻¹). The red-colored complexes were measured

within 1 hour using the same spectrophotometer as for urease activity but at $\lambda=485$ nm.

Data analysis

The toxicity of single metals on urease and dehydrogenase activities was determined using the dose-response relationships for the single metal exposure. We used the logistic model presented in Equation 15. This equation has three parameters because we normalized the enzymatic effects with a biocide.

$$E = \frac{E_{\max}}{1 + \exp \{ m (\log (D) - \log (EC_{50})) \}} \quad (15)$$

In Equation 15, E is the measured response of the enzymatic activity, E_{\max} is the maximum response of the enzymes in soil obtained with a control sample, m is the slope parameter of the dose-response curve, D is the applied dose, and EC_{50} is the concentration for which 50% of the enzymatic activity is inhibited. This generalized non-linear model was fit using the R software package, and since the variability of the error was not constant, as it is often the case in ecotoxicological bioassays, we transformed the data using a Box-Cox transformation [24].

The analysis of mixture toxicity was carried out by comparing the experimentally-observed responses with the toxicity predictions using the Loewe additivity and the Bliss independence calculated models. The usual equation to predict mixture toxicity, according to Loewe [4], is described in the Equation 16:

$$1 = \sum \frac{D_i}{EC_{y,i}} \quad (16)$$

where D_i = Dose of the i toxicant in the mixture yielding $y\%$ inhibition, $EC_{y,i}$ = concentration of the single toxicant i giving a $y\%$ inhibition. Although Equation 16 is the basis of many interactions approaches, it has the disadvantage of being restrictive

to one inhibition level. Therefore, Greco [6] proposed an alternate, yet consistent equation (Eqn. 17) that we used for our predictions:

$$1 = \sum \frac{D_i}{EC_{50,i} \left(\frac{E}{E_{con} - E} \right)^{1/m_i}} \quad (17)$$

where D_i = dose of the i toxicant in the mixture, $EC_{50,i}$ = concentration of the single toxicant i yielding 50% inhibition, E = measured response of the enzymatic activity in the mixture, E_{con} = control response in the mixture, and m_i is the slope parameter of the dose-response curve for the toxicant i . Equation 17 was resolved using the Maple software package [25]. Thus, we had the latitude to calculate the prediction at all inhibition levels.

The expected toxicities calculated from the Bliss independence model were obtained according to the equation (Eqn.18) :

$$f u_{12} = f u_1 \cdot f u_2 \quad (18)$$

where $f u_1, f u_2, f u_{12}$ = fractions of response unaffected by the components 1, 2 and their combinations [26]. In order to obtain the individual response fraction corresponding to a certain concentration as applied singly, the curves resulting from the application of the logistic model were used. It is useful to note that Equation 18 is also often expressed in term of inhibited fraction and then translated to Equation 19 which is analogous to Equation 18:

$$p_{12} = p_1 + p_2 - p_1 \cdot p_2 \quad (19)$$

where p_1, p_2 and p_{12} correspond to the inhibited fractions caused by component 1, 2 and their combinations.

Deviations from predictions for both the Loewe additivity and the Bliss independence models were considered to be significant when the predicted data were outside the 95% confidence limits of the mean observed data.

2.5 Results

Individual metal toxicities

Effects of copper, lead and cadmium on both dehydrogenase and urease activity are illustrated in Figure 9. All the dose-response data, which are averages of 4 replicates for the enzyme responses ($SD < 10\%$) and averages of duplicates for the metal concentrations, clearly show a S-shape curve. All the curves go through 0% of response because the data were normalized with a positive control using $600 \text{ mg Ag kg}^{-1}$ acting as a biocide. Those curves were estimated using the logistic model (Eqn. 15) with a Box-Cox transformation. Those transformations were justified since they were significant ($p < 0.05$) in all cases and the estimated residual variance was much lower. The choice to use the free metal activities, instead of the dissolved or total concentrations, was based on the estimated residual variances, which were significantly better for the dose-response curves using free metal activities; for example 77% and 99% lower than the dissolved and total Cu concentrations with the urease assay. Free metal activities also integrate the variation of the soil solution chemistry. The use of free ion is reasonable given that the free ion is the metal form recognized as the most available for uptake by organisms. The parameters of Equation 15 plus EC_{20} are displayed in Table IV for the three metals and the two bioassay. The EC_{20} and EC_{50} values show that lead is the least toxic with values of 81 and $378 \text{ } \mu\text{g Pb}^{2+} \text{ L}^{-1}$ for dehydrogenase activity and values of 207 and $442 \text{ } \mu\text{g Pb}^{2+} \text{ L}^{-1}$ for urease activity. Copper appears to be the most toxic metal for dehydrogenase enzyme, but cadmium seems the most toxic metal for urease enzyme. It should be mentioned that the 95% confidence intervals of cadmium parameters for dehydrogenase activity are high and this curve is the least significant. Additionally, the slope of the dose-response curves are not parallel with lead showing the steepest curve ($m = 4.6$ and 10.4 for dehydrogenase and urease activity respectively) and

cadmium showing the shallowest curve ($m = 1.3$ and 3.9 for dehydrogenase and urease respectively).

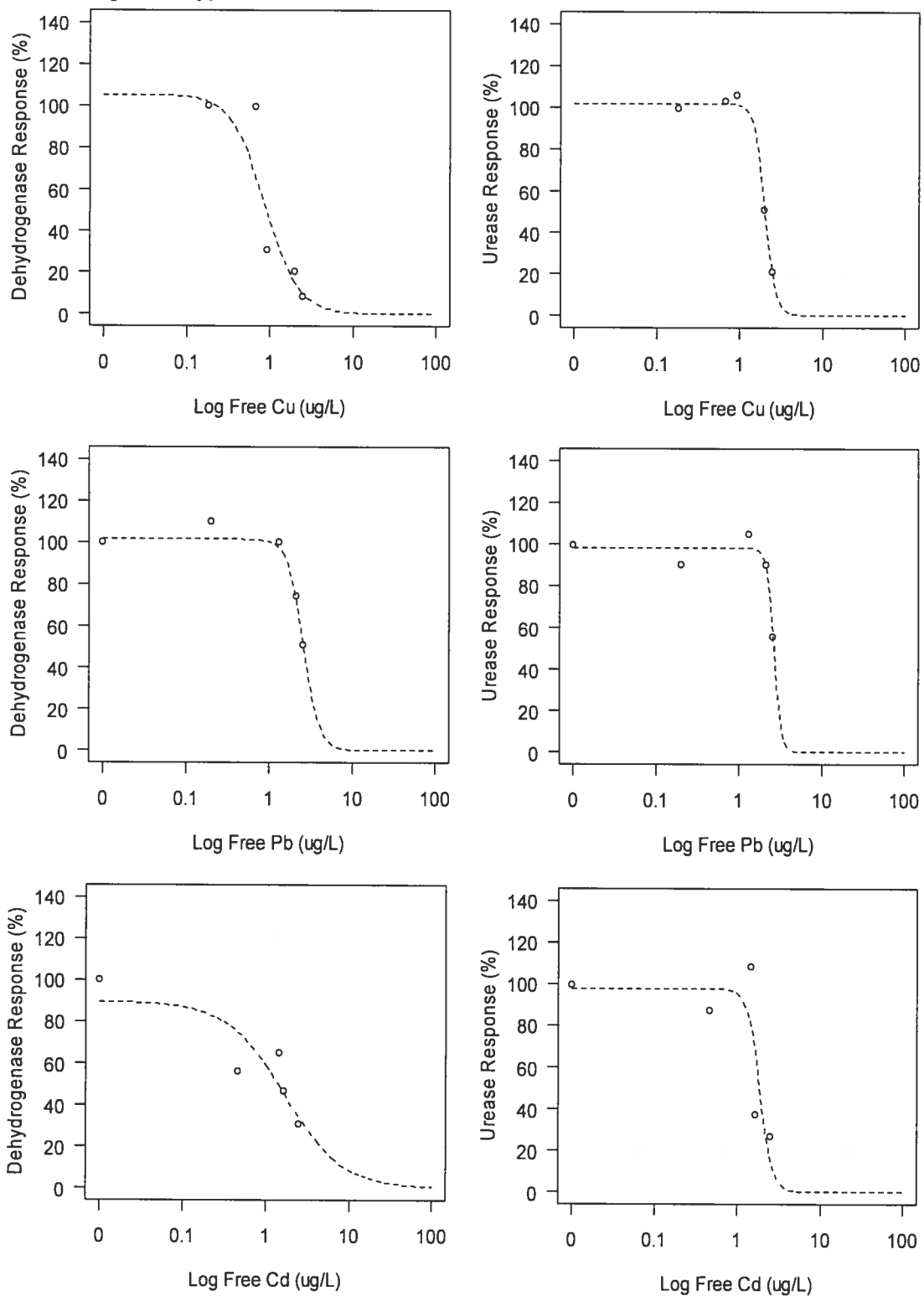


Figure 9. Dose-response curves of dehydrogenase and urease activity as a function of the mean log free dose of 4 replicates (SD < 10 %) for each individual metal.

Table IV. Measured dose-response curve parameters (\pm 95% CI) for individual metals of each bioassay^a

Component	E _{CON} (%) ^b	m ^c	EC ₂₀ (μg/L) ^d	EC ₅₀ (μg/L) ^d
<i>Dehydrogenase</i>				
Cu ²⁺	106 (14)	2.2 (0.3)	3 (2-4)	7 (5-10)
Pb ²⁺	101 (4)	4.6 (1.1)	81 (58-114)	378 (323-442)
Cd ²⁺	90 (26)	1.3 (2.2)	4 (0-108)	47 (3-784)
<i>Urease</i>				
Cu ²⁺	102 (1)	6.6 (0.4)	42 (39-46)	101 (97-106)
Pb ²⁺	98 (2)	10.4 (2.1)	207 (182-234)	442 (406-481)
Cd ²⁺	97 (7)	3.9 (0.8)	21 (14-30)	76 (56-104)

^a Parameters calculated using Eq. (1) from R package software (R Development Core Team, 2005).

^b Control effect

^c Slope parameter

^d Concentration inhibiting 20% or 50% of the enzyme activity.

Chemical effects of combinations

We have studied the effects of metal combination on different physicochemical parameters, i.e., we add a metal to an individual metal and we studied the impact on the mostly influent physicochemical parameters. The parameters involved are the following: dissolved organic carbon contents, pH, anion concentrations, dissolved calcium contents, dissolved metal concentrations and free ionic metal activities. The most significant correlation is observed by comparing combined metal concentrations with the free ionic metal activities. As illustrated in Figure 10, an increasing addition of lead to two copper spiked soils yield lower Cu²⁺ in solution. For example, a spiked soil with 465 mg Cu kg⁻¹ gives 102 μg Cu²⁺ L⁻¹. The additions of 1020 and 2340 mg Pb kg⁻¹ to the copper-spiked soil decrease the Cu²⁺ activity to 34 and 22 μg Cu²⁺ L⁻¹ respectively. The pattern was not observed with cadmium binary mixtures. The free cadmium activities increase in mixtures in comparison to the soil spiked with cadmium alone.

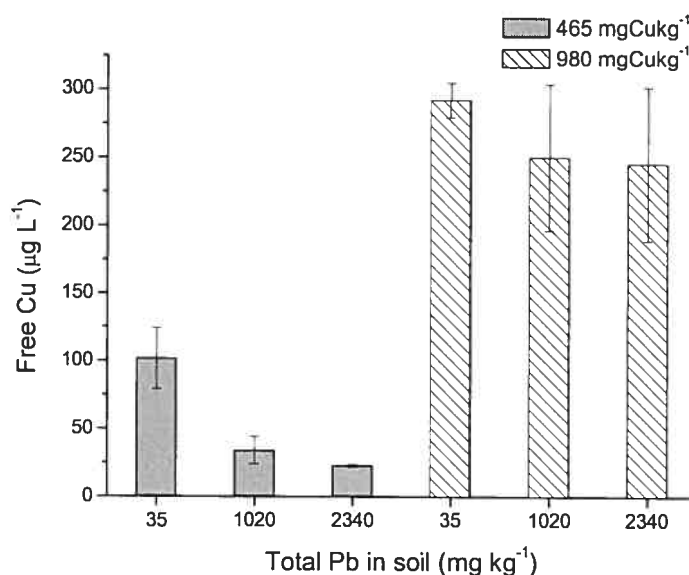


Figure 10. Effect of lead on copper speciation, adding Pb decreases free Cu in solution.

Observed toxicity of mixtures

Cu^{2+} and Pb^{2+} activities are lower in binary mixtures relative to the equivalent soil total metal concentrations for the single metal exposure. Figure 11 shows the dose-response relationship of urease activity and free copper activity. The addition of lead to a copper spiked soil stimulates urease activity. At a specific total copper concentration (465 mg Cu kg^{-1}), 50% of urease response is measured; the addition of 1020 mg Pb kg^{-1} gives 127% of the initial response and the addition of 2340 mg Pb kg^{-1} gives 186%. The same trend is also observed with the dehydrogenase assay. The conclusion from our observations suggests that in the system we studied, the toxicity of binary mixtures is lower than the toxicity of the corresponding individual metals.

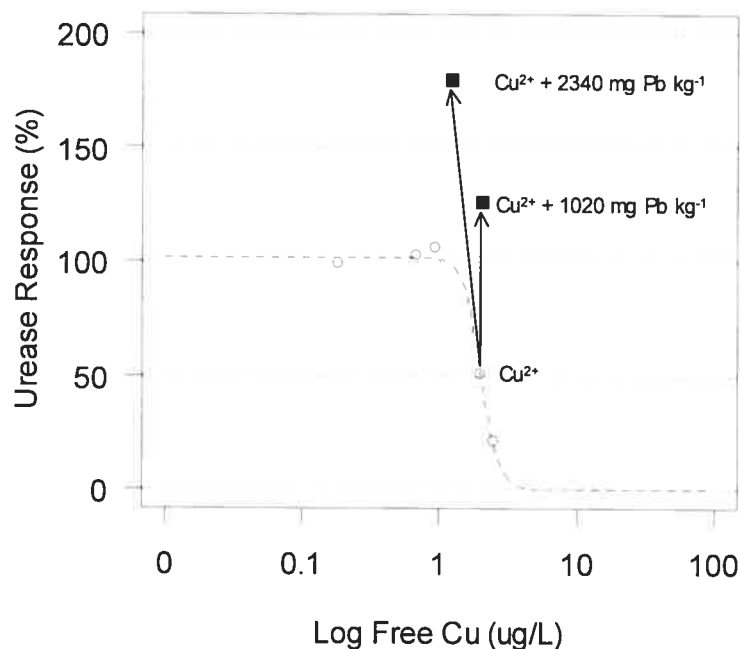


Figure 11. Observed effect of lead and copper on urease activity, adding Pb to Cu stimulates urease activity. Open points (○) indicate the effect of Cu applied singly and the dashed line (---) is the corresponding dose-response curve. Squares (■) represents the effect of the Cu and Pb combination.

Predicted mixture toxicity versus observed mixture toxicity

Predicted data calculated from Bliss independence and Loewe additivity models are presented in Table V and VI for both enzyme assays. By comparing the observed data with every prediction, the results show Bliss antagonism (BANT) and Loewe antagonism (LANT) for all combinations. In general, the values obtained by the Bliss independence model are closer to the observed data than those obtained from the Loewe additivity model (Fig. 12 and 13). It can also be noted that some measured effects of combinations, especially in the case of the dehydrogenase assay, are not different from the prediction. In addition, for some metal combinations we observed an hormetic response, i.e., we saw a positive stimulation of the enzyme for the response due to exposure to the combination of metals relative to the control. This case is especially significant for the dehydrogenase assay with the combination of lead and cadmium.

Table V. Comparison of predicted data and measured data for dehydrogenase activity by Bliss independence and Loewe additivity models (Greco et al., 1995)

Mixture Concentrations (µg/L)			Calculated enzymatic response for individual metals (%) ^a			Mean measured response for the combinations (%) (± 95% CI) ^b	Predicted response from Bliss independence model (%) ^c	Conclusion from fractional product comparison ^d	Predicted response from Loewe additivity model (%) ^e	Conclusion from Loewe additivity comparison ^f
Cu ²⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺	Cu ²⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺					
245	738		10	38		13 (10)	4	NS	2	LANT
	198	58		64	43	116 (19)	28	BANT	19	LANT
219		124	11		39	37 (12)	4	BANT	7	LANT
34	70		23	84		65 (3)	20	BANT	8	LANT
	73	14		83	55	149 (20)	47	BANT	32	LANT
31		47	24		45	46 (2)	11	BANT	14	LANT
250	111		10	76		20 (14)	8	NS	4	LANT
	23	302	28	55		71 (24)	16	BANT	7	LANT
		107		76	39	85 (20)	30	BANT	20	LANT
		347		52	46	106 (4)	24	BANT	18	LANT
	25		28		44	43 (12)	12	BANT	15	LANT
	183		12		42	31 (3)	5	BANT	8	LANT
	51	114	20	75	41	16 (11)	6	NS	5	LANT
	377	783	9	37	34	21 (9)	1	BANT	2	LANT

^a From the logistic equation (Eq. 15).

^b Averages of 4 replicates with the 95 % confidence interval (CI).

^c Each calculated response for individual metals were divided by the average of the control responses (99%), then the fractional responses were multiplied following Eq. (18), and this product was multiplied by the average control responses to yield the predicted data.

^d Measured responses are greater than the predicted data, then Bliss antagonism (BANT) is recorded.

NS means insignificant at 95 % CI.

^e Data obtained with Eq. (17).

^f Measured responses are higher than the predicted data, then Loewe antagonism (LANT) is recorded.

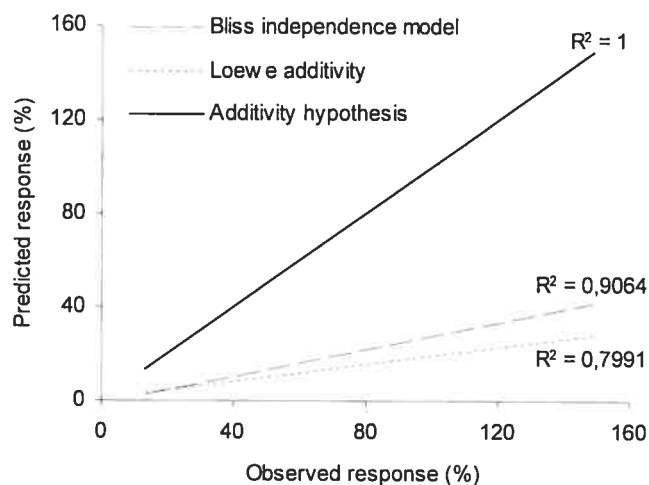


Figure 12. Comparison of predicted data and measured data for dehydrogenase activity by Bliss independence and Loewe additivity models

Table VI. Comparison of predicted data and measured data for urease activity by Bliss independence and Loewe additivity models (Greco et al., 1995)

Mixture Concentrations (µg/L)			Calculated response for individual metals (%) ^a			Mean measured response for the combinations (%) (± 95% CI) ^b	Predicted response from Bliss independence model (%) ^c	Conclusion from fractional product comparison ^d	Predicted response from Loewe additivity model (%) ^e	Conclusion from Loewe additivity comparison ^f
Cu ²⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺	Cu ²⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺					
245	738		24	30		44 (2)	7	BANT	0	LANT
	198	58		80	55	147 (7)	44	BANT	3	LANT
219		124	27		39	20 (1)	11	BANT	2	LANT
34	70		87	96		127 (3)	84	BANT	4	LANT
	73	14		96	85	297 (8)	82	BANT	17	LANT
31		47	89		60	84 (5)	54	BANT	9	LANT
250	111		24	92		71 (2)	22	BANT	1	LANT
23	302		95	65		186 (2)	62	BANT	2	LANT
	107	107		92	42	94 (2)	39	BANT	3	LANT
	347	42		59	62	168 (3)	23	BANT	2	LANT
25		56	94		56	122 (6)	53	BANT	9	LANT
183		75	32		49	72 (3)	16	BANT	2	LANT
51	114	77	76	91	48	33 (2)	34	NS	0	LANT
377	783	279	16	28	26	31 (1)	1	BANT	0	LANT

^a From the logistic equation (Eq. 15).

^b Averages of 4 replicates with the 95 % confidence interval (CI).

^c Each calculated response for individual metals were divided by the average of the control responses (99%), then the fractional responses were multiplied following Eq. (18), and this product was multiplied by the average control responses to yield the predicted data.

^d Measured effects are greater than the predicted data. then Bliss antagonism (BANT) is recorded. NS means insignificant at 95 % CI.

^e Data obtained with Eq. (17).

^f Measured responses are higher than the predicted data. then Loewe antagonism (LANT) is recorded.

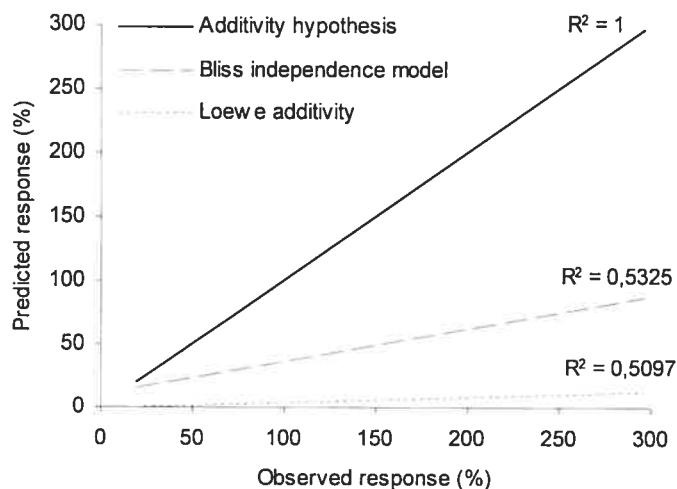


Figure 13. Comparison of predicted data and measured data for urease activity by Bliss independence and Loewe additivity models

2.6 Discussion

Effects of trace metals on soil microbial activity have been reviewed extensively [27-28], but to our knowledge, this is the first study on the toxic effect of combined metals on enzyme activities that also incorporates chemical speciation of the metals. Enzyme assays were chosen as biological targets because they are sensitive, rapid, inexpensive and representative of the metabolic capacity of soil but also for their mechanism differences. Indeed, dehydrogenase is an endocellular enzyme and lives only inside intact, living cells [28], while urease is an exocellular enzyme. However, Chander and Brookes [29] suggested that the assay for dehydrogenase activity is subject to interference from Cu in soil, because Cu prevents the red colour development of the released product triphenyl formazan. Their study tested the color reaction using a range of 0-100 mg Cu L⁻¹, a decrease in absorbance of triphenyl formazan of 5% at a concentration of 1 mg Cu L⁻¹ was reported. All the Cu content in soil solution extracts from the present study contains Cu concentrations lower than 1 mg Cu L⁻¹ (< 828 µg Cu L⁻¹). Therefore, we conclude that this abiotic reaction does not interfere with our results.

Our results clearly demonstrate a dose-response relationship (Fig. 9) for each single metal (Pb, Cd, Cu) and both enzyme assays. Every enzyme response was normalized with Ag₂SO₄ as a biocide in order to limit microbial activity and correct for abiotic response. This biocide was also used by Qureshi et al. [30] and they reported that silver was uniformly effective at limiting microbial activity. The dehydrogenase and urease responses reported in this paper corroborate with the data mentioned by Bååth [27]. However, comparison is limited given that data differ among physicochemical characteristics of soils and analytical methods.

Once the dose-response relationships were established, we analyzed the effect of the chemistry on the enzyme activities (Fig. 10). As mentioned earlier, the comparison of two samples, one containing only copper and the other containing copper in presence of lead or cadmium, reduced free copper activity. This result is difficult to explain, we hypothesize that given the relatively similar chemical behavior and low solubility

of Cu and Pb [31] they would tend to compete for sorption and complexation. One of the means to reduce the free metal activity would then be if the added Pb outcompetes some of the Cu-DOM complexes and forces Cu back onto the solid phase or within insoluble metal complexes [32]. On the other hand, the higher free cadmium activity in the mixtures may be explained by the lower solubility of Cd which would suggest that the Cd ions displaced by Cu or Pb from complexes or soil surfaces would tend to remain in the soil solution and result in a higher free Cd activity in the presence of the competing metals Cu and Pb.

The findings of antagonistic effects in relation to copper bring us to predict mixture toxicity with the Bliss independence and the Loewe additivity model. These models are useful to compare the predicted and observed data and assign an antagonistic or synergistic effect to the data deviating from the predictions. Our results showed antagonistic effects for every combination and both models. Choosing the best model needed to predict the pertinent data is not obvious since in this study, the modes of action of various components are for the most part unknown. A current practice in these situations is to compare the parallelism of dose-response curves [2-3, 33]. Curves having a similar shape indicate components acting with a similar mode of action and thus the Loewe additivity model is required. In Table IV, and as mentioned previously, the slope of dose-response curves are generally not parallel. Therefore, the dissimilar shape of the curves suggests that metals may have different modes of action. However, Greco [6] reported that constraint of Equation 16 can be obeyed for two components with different concentration-effect slopes (e.g. Eqn. 17) that presumably would not act at the same site. On the other hand, in many combinations, Bliss predictions are closer to the observed data than the one predicted by Loewe's. This behavior may be explained if metals in the mixture act with different modes of action. Faust et al. [34] reported that Loewe additivity model gives good predictions for mixtures of similarly acting compounds but tends to overestimate the combined toxicity of mixtures including dissimilarly acting compounds. Thus, it is not clear whether Bliss independence model better predict

mixture toxicity than Loewe additivity model, but the behavior of the combinations seems to indicate different modes of action.

In the literature, a review of 68 publications of the effect of metal mixtures on aquatic biota revealed that 30% of the cases were more than additive, 43% were less than additive and 27% were strict addition [35]. In soils, the few data available, as cited earlier, have also shown heterogeneous effects. The large variability encountered may be dependent on the physicochemical conditions of the exposure environment and on the biological target exposed. Clearly, more research is needed in the study of metal mixture toxicity.

In conclusion, a study of the toxicity of trace metals alone and in mixtures (Cd, Cu, Pb) to the soil enzymes dehydrogenase and urease was conducted. Results obtained from the mixture toxicity investigation yield antagonistic effects as predicted from either Bliss independence and Loewe additivity model. Nonetheless, the results suggest that the Bliss independence model may be appropriate to predict metal mixture toxicity. Moreover, combining metals together will modify their speciation. In binary mixtures, lower free Pb^{2+} and free Cu^{2+} activities were measured in comparison to the individual metal treatments. Thus, binary mixtures of lead and copper stimulate the enzymatic activities in comparison to the individual copper response.

2.7 Acknowledgements

The authors acknowledge the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies for their financial support.

2.8 References

1. Khalil MA, Abdel-Lateif HM, Bayoumi BM, Van Straalen NM. 1996. Analysis of separate and combined effects of heavy metals on the growth of *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta; Annelida), using the toxic unit approach. *App Soil Ecol* 4:213-219.
2. Van Gestel CAM, Hensbergen PJ. 1997. Interaction of cd and zn toxicity for *Folsomia candida willem* (collembola: isotomidae) in relation to bioavailability in soil. *Environ Toxicol Chem* 16:1177-1186.
3. Sharma SS, Schat H, Vooijs R, Van Heerwaarden LM. 1999. Combination toxicology of copper, zinc, and cadmium in binary mixtures: concentration-dependent antagonistic, nonadditive, and synergistic effects on root growth in *Silene vulgaris*. *Environ Toxicol Chem* 18:348-355.
4. Loewe S, Muischnek H. 1926. Effect of combinations: mathematical basis of problem. *Arch. Exp Pathol Phamakol* 114:313-326.
5. Bliss CI. 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann Appl Biol* 26:585-615.
6. Greco WR, Bravo G, Parsons JC. 1995. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol Rev* 47:331-385.
7. Berenbaum MC. 1985. The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J Theor Biol* 114:413-431.
8. Hermens J, Leeuwangh P. 1982. Joint toxicity of mixtures of 8 and 24 chemicals to the guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol Environ Saf* 6:302-310.

9. Deneer JW, Seinen W, Hermens JLM. 1988. Growth of *Daphnia magna* exposed to mixtures of chemicals with diverse modes of action. *Ecotoxicol Environ Saf* 15:72-77.
10. Altenburger R, Boedeker W, Faust M, Grimme LH. 1996. Regulations for combined effects of pollutants: consequences from risk assessment in aquatic toxicology. *Food Chem Toxicol* 34:1155-1157.
11. Faust M, Altenburger R, Backhaus T, Blanck H, Boedeker W, Gramatica P, Hamer V, Scholze M, Vighi M, Grimme LH. 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquat Toxicol* 63:43-63.
12. Grote M, Brack W, Walter HA, Altenburger R. 2005. Confirmation of cause-effect relationships using effect-directed analysis for complex environmental samples. *Environ Toxicol Chem* 24:1420-1427.
13. Nolan AL, Lombi E, McLaughlin MJ. 2003. Metal bioaccumulation and toxicity in soils-why bother with speciation?. *Aust J Chem* 56:77-91.
14. Sauvé S. 2003. The role of chemical speciation in bioavailability. In Naidu R, Gupta VVSR, Rogers S, Kookana RS, Bolan NS, Adriano DC, eds, *Bioavailability, Toxicity and Risk Relationships in Ecosystems*. Science Publishers, Enfield, NH, USA, pp 59-82.
15. Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME). 2003. Canadian Environmental Quality Guidelines. Winnipeg, MN, Canada.
16. Tiessen H, Moir JO. 1993 Total organic carbon. In Carter MR, ed, *Soil Sampling and Methods Analysis*. Lewis Publishers, Ottawa, ON, Canada, pp 187-200.

17. Hendershot WH, Lalonde H. 1993. Ion exchange and exchangeable cations. In Carter MR, ed, *Soil Sampling and Methods Analysis*. Lewis Publishers, Ottawa, ON, Canada, pp 167-176.
18. Sauvé S, McBride MB, Hendershot WH. 1995. Ion-selective electrode measurements of copper(II) activity in contaminated soils. *Arch Environ Contam Toxicol* 29:373-379.
19. Sauvé S, McBride M, Hendershot W. 1998. Lead phosphate solubility in water and soil suspensions. *Environ Sci Technol* 32:388-393.
20. Sauvé S, Norvell WA, McBride M, Hendershot W. 2000. Speciation and complexation of cadmium in extracted soil solutions. *Environ Sci Technol* 34:291-296.
21. Tabatabai MA, Dick WA. 2002. Enzymes in soil. In Burns RG, Dick RP, eds, *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker, New York, NY, USA, pp 567-596.
22. Kandeler E. 1996. Urease activity by colorimetric technique. In Schinner F, Kandeler E, Öhlinger R, Margesin R, eds, *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 171-174.
23. Tabatabai MA. 1994. Soil enzymes. In Weaver RW, Angel JS, Bottomley PS, eds, *Methods of Soil Analysis, Part 2—Microbiological and Biochemical Properties*, SSSA Book Series No 5. Soil Science of Society of America, Madison, WI, USA, pp 775-833.

24. R Development Core Team. 2005. *R 2.1.0: A Language and Environment for Statistical Computing*©. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.r-project.org> (viewed November 13, 2005).
25. Maplesoft. 2004. *Maple 9.50™*. Waterloo, ON, Canada, <http://www.maplesoft.com> (viewed november 5, 2005).
26. Chou TC, Talalay P. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22:27-55.
27. Bååth E. 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water Air Soil Pollut* 47:335-379.
28. Brookes PC. 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biol Fertil Soils* 19:269-279.
29. Chander K, Brookes PC. 1991. Is the dehydrogenase assay invalid as a method to estimate microbial activity in copper-contaminated soils?. *Soil Biol Biochem* 23:909-915.
30. Qureshi S, Richards BK, Hay AG, Tsai CC, McBride MB, Baveye P, Steenhuis TS. 2003. Effect of microbial activity on trace element release from sewage sludge. *Environ Sci Technol* 37:3361-3366.
31. Hayes KF, Traina SJ. 1998. Metal ion speciation and its significance in ecosystem health. In Huang PM, ed, *Soil Chemistry and Ecosystem Health*. SSSA Spec Pub no 52, SSSA, Madison, WI, USA, pp 45-84.
32. Moreno JL, Garcia C, Landi L, Falchini L, Pietramellara G, Nannipieri P. 2001. The ecological dose value (ED50) for assessing Cd toxicity on ATP

content and dehydrogenase and urease activities of soil. *Soil Biol Biochem* 33:483-489.

33. Altenburger R, Schmitt H, Schüürmann G. 2005. Algal toxicity of nitrobenzenes: combined effect analysis as a pharmacological probe for similar modes of interaction. *Environ Toxicol Chem* 24:324-333.
34. Faust M, Altenburger R, Backhaus T, Boedeker W, Scholze M, Grimme LH. 2000. Predictive assessment of the aquatic toxicity of multiple chemical mixtures. *J Environ Qual* 29:1063-1068.
35. Norwood WP, Borgmann U, Dixon DG, Wallace A. 2003. Effects of metal mixtures on aquatic biota : a review of observations and methods. *Hum Ecol Risk Assess* 9:795-811.

3 TOXICITÉ DES MÉTAUX COMBINÉS (Ag, Cu, Hg, Zn) SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

3.1 Avant-propos

La deuxième étude porte sur l'action individuelle et conjuguée des métaux tels que l'argent, le cuivre, le mercure et le zinc sur l'activité enzymatique du sol. Les enzymes étudiées sont la déshydrogénase et l'uréase. Un sol forestier-sablonneux et un sol agricole ont été contaminés et leurs concentrations en anions ont été normalisées. Ces sols ont été équilibrés sur une période de un mois, puis lessivés pour enlever l'excès d'anions. Dans cette étude, la concentration en métaux totaux et dissous a été mesurée. L'activité des ions libres de l'argent et du mercure dans le sol n'a pas été mesurée puisque cela constitue un défi analytique substantiel. Ainsi, nous avons évalué les courbes dose-réponses des métaux et de l'activité enzymatique à l'aide d'une équation de régression non-linéaire logistique. Les valeurs de EC_{50} ont montré que l'Ag et le Hg étaient les métaux les plus toxiques pour les enzymes. Puis, toutes les pentes des courbes étaient hétérogènes et par conséquent, tel que mentionné dans l'étude précédente, nous avons sélectionné le modèle de l'indépendance de Bliss pour prédire la toxicité des mélanges. Nous avons obtenu, en fonction des métaux totaux, des effets de combinaison antagonistes pour le sol forestier-sablonneux et des effets synergiques pour le sol agricole. Les réponses enzymatiques des métaux dissous étaient plus variables que celles des métaux totaux. Par conséquent, pour les métaux dissous, nous avons mesuré des effets variables, c'est-à-dire des effets parfois synergiques et parfois antagonistes.

EFFECT OF METAL MIXTURES (Ag, Cu, Hg, Zn) ON SOIL
DEHYDROGENASE AND UREASE

(Submitted to Soil Biology and Biochemistry)

Sophie Chaperon and Sébastien Sauvé*

Department of Chemistry, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Centre-Ville, Montreal, QC, Canada, H3C 3J7

3.2 Abstract

A study of the individual and mixture toxicities of trace metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to the soil enzymes dehydrogenase and urease was undertaken. The investigation was applied to an agricultural soil and a sandy forest soil. The soils were spiked with various metal salts, normalized for anions, equilibrated and leached to reduce the excess of anions. Total and dissolved metal concentrations were measured concurrently in order to consider the effect of soil chemistry on the enzyme activities. Dose-response relationships were estimated for each metal separately following a log-logistic curve fitting. Ag and Hg were the most toxic metals to the soil enzymes. The Bliss independence model was used to predict the toxicity of metal combinations. The enzyme responses in relation to the total metal concentrations combinations were synergistic for the agricultural soil and antagonistic for the sandy forest soil; possibly as a result of a higher organic matter content, water holding capacity and pH in the latter soil. Enzyme responses expressed in relation to the dissolved metal concentrations were more variable than against the total metal contents and thus we observed both synergistic and antagonistic interactions.

Keywords: Trace metals; Mixture toxicity; Dehydrogenase; Urease; Joint action models

3.3 Introduction

Many studies related to the toxicity of metals on enzyme activities in soils are available in the literature (Bååth, 1989; Kandeler et al., 1996; Stuczynski et al., 2003). This interest is partly because enzymes are highly sensitive to trace metals and the methodology is rapid, simple and inexpensive. Trace metals affect the growth, morphology and metabolism of microorganisms in soils, through functional disturbance, protein denaturation or the destruction of the integrity of cell membranes (Kandeler et al., 1996). Therefore, enzyme assays are useful indicators of soil pollution because enzyme catalyze many biochemical reactions essential to maintain a good microbial activity. However, very few data on the combined metal toxicities in relation to microorganisms were undertaken and contaminated ecosystems are usually polluted with a multitude of toxicants. More studies on the toxicity of combined metals do exist in the aquatic literature but no clear environmental guidelines are formulated since results are scattered. Indeed, Norwood et al. (2003) provided a comprehensive review of 68 publications on the effects of metal mixtures on aquatic biota which reveals that 30 % of the cases were more than additive, 43 % were less than additive and 27 % were strict addition. The variability of the data, as explained by Norwood et al. (2003), occurs because different species were tested, organisms were exposed to variable metal numbers, types and concentrations in the mixture. Another impact arises from the type of method used to determine the interactions. The few results available in soils, show that additive, synergistic or antagonistic effects can all be expected (Khalil et al., 1996; Van Gestel et al., 1997; Sharma et al., 1999). The term additive effect, sometimes referred to as dose additivity, Loewe additivity, concentration additivity, response additivity or Bliss independence, is used to describe a “no interaction action” or a zero interaction between metals. A toxicity greater than additive is described as a synergistic effect, while terms such as antagonistic or inhibition effects are commonly used to describe a toxicity lower than the additive effect (Könemann and Pieters, 1996).

Various models have been used to evaluate the effect of mixtures on organisms. However, the majority of these models refers to the basic concepts of Loewe additivity and Bliss independence (Loewe and Muischnek, 1926; Bliss, 1939). Loewe additivity, which is also called dose additivity, concentration additivity or Toxic Unit approach, considers that a toxicant cannot interact with itself and that each toxicant in the mixtures acts in the same way, by the same mechanisms and reaches the same biological target. Components following these characteristics are also named to act in a simple similar action. On the other hand, Bliss Independence (response additivity) is based on the assumption that the mode of action and possibly, but not necessarily, the nature and the site of the effect differ among the toxicants in the mixtures. Components following these characteristics are also presumed to act in a simple dissimilar action. Thus, a fundamental difficulty is to choose between these noninteractive models without having enough information on the mechanistic action of trace metals.

In addition, the reported studies focuses on the total elemental content of soils which is recognized to overestimate the toxicity encountered. Indeed, bioavailability of metals is influenced by; (1) chemical and physicochemical interactions with other constituents of the soil; (2) physiological interactions affecting uptake from soil solution and determining the quantity available at the site(s) of action; and (3) interactions at the intoxication processes, including combination with receptors at the target site(s) (Van Gestel et al., 1997).

The aim of this study was to better understand mixture toxicities encountered in soils with an attention to the bioavailability of metals. For this purpose, we have determined the dose-response curve of each individual metal (Ag, Cu, Hg, Zn) using their total and soluble metal concentrations. Cu and Zn were chosen because they are common contaminants in soil. Ag and Hg are less common contaminants but they are highly toxic for soil enzymes. We then predicted the toxicity of the metal mixtures. The predicted and observed responses were compared to determine whether there is an additive, synergistic or antagonistic interaction in the metal combinations. Our

biological targets were the enzymes urease and dehydrogenase. Urease catalyzes the transformation of urea into ammonia and dehydrogenase catalyzes the transfer of electrons in many oxydoreduction processes of organic compounds.

3.4 Material & Methods

Soil samples

A sandy-type forest soil was obtained by a local supplier (Valbo, Laval, Qc, Canada). A second soil was collected, which is an agricultural soil (*Gray-brown luvisol*), from the surface (0-20 cm) layer at the Macdonald Campus of McGill University (Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada). Physical characteristics of soils are given in Table VII.

Table VII. Selected characteristics of soils.

Soil	pH _{CaCl2} ^a (0.01M)	% OM ^{b,c}	% Clay (<2 µm)	% Silt (2-53 µm)	% Sand (53-2,000 µm)	CEC ^{d,e} (cmol _c kg ⁻¹)	% WHC ^f
Forest	7.2	21	1	8	91	70	80
Agricultural	5.8	6	1	17	82	30	40

^a Hendershot and Lalande (1993a)

^b OM = organic matter

^c Tiessen and Moir (1993)

^d CEC = cation exchange capacity

^e Hendershot and Lalande (1993b)

^f WHC = water holding capacity; ISO
(InternationalStandard Organization) (1993)

Both soils were sieved moist to $\leq 2\text{mm}$ and spiked with a concentration 25 % higher than our objective given that the soils were prepared to be leached to reduce the excess anions. The choice of the concentrations were based on the soil quality criteria of the Canadian Environmental Quality Guidelines (Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME), 2003). Thus, about 500 g of soils were spiked with Ag_2SO_4 , CuCl_2 , HgCl_2 and ZnCl_2 in order to obtain 5, 10, 20, 40 and 80 mg Ag kg⁻¹ dry soil; 50, 100, 200, 500 and 1000 mg Cu kg⁻¹ dry soil; 5, 10, 20, 40 and 80 mg Hg kg⁻¹ dry soil; and 200, 400, 750, 1500 and 3000 mg Zn kg⁻¹. Because of expected low toxicity, the agricultural soil was also spiked with 3000 mg Cu kg⁻¹, 300 mg Hg kg⁻¹ and 5000 mg Zn kg⁻¹. A control soil was spiked with 600 mg Ag kg⁻¹ dry soil to act as a positive control biocide. The samples were then normalized for anions with a

calcium salt and therefore each metal as his own anion-balanced control. Deionized water was added until about 500 g of soil reached 90 % of its WHC (water holding capacity) and the spiked soils were then shaken by hand. Samples were equilibrated for 3 days at room temperature, then dried overnight at 37 °C, rewetted to their 90 % WHC and shaken by hand. These steps were repeated over a 30-d period. Samples were then leached using deionized water with a quantity corresponding to the WHC of the soils. Lixiviations were done overnight by placing the soils in polycarbonate tubes and on a commercial geotextile membrane. Finally, samples were air-dried for two weeks before proceeding to the enzyme assays.

Chemical analysis

Soil solutions were obtained by adding 45 mL of deionized water to 10 g of dried soil in 50-mL centrifuge tubes. The tubes were shaken overnight on a reciprocal shaker and centrifuged at 5,000g for 15 min to separate the supernatants. The solutions were then filtered through 0.45- μ m cellulosic membranes. The extracts were preserved with 2% HNO₃ until total dissolved metals were analyzed by ICP-AES (Iris advantage/1000 from Jarrell Ash corporation, U.S.A) and ICP-MS (Ultramass 700 from Varian, Australia).

Total soil metals were determined using a microwave digestion of ~0.3 g of powdered soil in 10 mL of concentrated HNO₃ in Teflon[®] bombs. Digests were made up to 100 mL and analyzed by ICP-AES (Iris advantage/1000 from Jarrell Ash corporation, U.S.A).

Bioassays

The results of both dehydrogenase and urease were normalized with 600 mg Ag kg⁻¹ as Ag₂SO₄ to act as a biocide. The data were reported in term of % response. Each sample was analyzed in 4 replicates and controls and blanks were added with each batch. For both methods, no pH buffers were added in order to minimize effects upon the speciation and to measure the response as it occurs in the soil (Tabatabai and Dick, 2002).

Urease activity in soils was assessed as the capacity of the enzyme to catalyze the transformation of urea into ammonium (Kandeler, 1996). The non-buffered method was used. This method involves the incubation of the soils with urea for 2 h at 37°C. The released ammonium is extracted with a potassium chloride solution, and the resulting suspensions were filtrated (Fisherbrand Q8 paper filter). The filtrates were analyzed by a modified Berthelot reaction, in which a reaction of sodium salicylate with NH_3 in presence of sodium dichloroisocyanurate takes place to form a green-colored complex. This complex was quantified with a CECIL Instruments CE4002 spectrophotometer at $\lambda=690$ nm after a 30-min color development period.

The dehydrogenase activity analysis, involves the measure of triphenyl formazan (TPF) produced from the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC) (Tabatabai, 1994). Samples of 5 g of air-dried soil were placed in 50-mL centrifuge tubes. To each tube, 1 mL of 3 % TTC and 5 mL of deionized water were added. Then the samples were mixed on a vortex, the tubes were stopped and incubated in the dark for 24 h at 37°C. After the incubation, 10 mL of methanol were added, the samples were shaken and filtered (Fisherbrand Q8 paper filter). An additional 10 mL of methanol were added to wash the tubes. Then, for calibration, 7 standards of TPF were prepared (0.5, 1, 3, 5, 7, 10 and 15 μg of TPF mL^{-1}). The red-colored complexes were measured within 1 hour using the same spectrophotometer as for urease activity but at $\lambda=485$ nm.

Data analysis

The toxicity of single metals on urease and dehydrogenase activities was determined using the dose-response relationships for the single metal exposure. We used the logistic model presented in Equation 20. This equation has three parameters because we normalized the enzymatic effects with a biocide.

$$E = \frac{E_{CON}}{1 + \exp \{ m (\log (D) - \log (EC_{50})) \}} \quad (20)$$

In equation 20, E is the measured response of the enzymatic activity, E_{CON} is the soil enzyme response corresponding to the dose control, m is the slope parameter around EC_{50} , D is the applied dose, and EC_{50} is the concentration for which 50% of the enzymatic activity is inhibited. This generalized non-linear model was fit using the R software package, and since the variability of the error was not constant, as it is often the case in ecotoxicological bioassays, we transformed the data using a Box-Cox transformation (R Development Core Team, 2005). However, a part of our data was not fitted with the logistic model because hormesis trends occurred. Therefore we used a modification of the logistic model proposed by Brain and Cousens (1989):

$$E = \frac{E_{CON} + f(D)}{1 + \exp \{ m (\log (D) - \log (EC_{50})) \}} \quad (21)$$

The parameter $f(D)$ measures the degree of stimulation by the chemical. The other parameters remain the same.

The analysis of mixture toxicity was carried out by comparing the experimentally observed responses with the toxicity prediction calculated using the Bliss independence model. Expected toxicities are obtained according to the following equation:

$$f u_{12} = f u_1 \cdot f u_2 \quad (22)$$

where $f u_1$, $f u_2$, $f u_{12}$ = fractions of response unaffected by the components 1, 2 and their combinations (Chou and Talalay, 1984). In order to obtain the individual response fraction corresponding to a certain concentration as applied singly, the equations resulting from the application of the logistic models were used. Experimentally observed responses fitting the Bliss independence model are assumed to act in an additive manner. Antagonistic and synergistic interactions are obtained if the observed data are respectively significantly higher and lower than the expected data.

Deviations from predictions for the Bliss independence model were considered to be significant when the predicted data were outside the 95% confidence limits of the mean observed data.

3.5 Results

Toxicity of individual metals

Effect of trace metals on dehydrogenase and urease exhibited a significant ($p < 0.001$, ANOVA test) dose-response relationship in all laboratory-spiked soils. Figure 14 and Figure 15 illustrate, for the forest soil, the dose-response curves of dehydrogenase and urease versus total metal concentrations (Ag, Cu, Hg, Zn). The trends are the same for the soluble metal concentrations. All graphics were obtained from the averages of 4 replicates of the enzyme assays and a mean of duplicates of the metal concentrations. Each graph go through zero because response were normalized with a positive control (Ag_2SO_4). Those curves were estimated by the logistic function (Eqn. 20), except for the spiked mercury forest soil for which the dose-response curves were estimated by the modified logistic function (Eqn. 21). In each case a Box-Cox transformation was applied. Those transformations were justified since they were significant ($p < 0.05$) in all cases and the estimated residual variance was much lower. The graphics involving mercury for both enzymatic assay (Fig.14 & 15), show an hormetic response. This observation is common in mercury toxicology (Sauvé et al., 2002; Calabrese and Baldwin, 2003). However, no hormetic response was observed with the agricultural soil.

The dose-response curve parameters for the forest soil and the agricultural soil are presented in Table VIII and Table IX. We compared the variability of the parameters between total metal and dissolved metal concentrations. We expected the variability of the parameter toxicities in relation to dissolved metals would be significantly lower than those with total metals. Dissolved metals are known to improve the integration of physicochemical variability of soils in comparison to total metals because

exposure of plants and soil microorganisms to metals is primarily realized through the soil's aqueous phase (Plette et al., 1999). However, 95% confident intervals from slope, EC_{25} and EC_{50} of both soils did not reveal a lower variation for dissolved metals. The EC_{50} for dissolved Hg in the agricultural soil even had a larger variation. On this basis, we treated the mixture toxicity data using both the total and the dissolved metal concentrations.

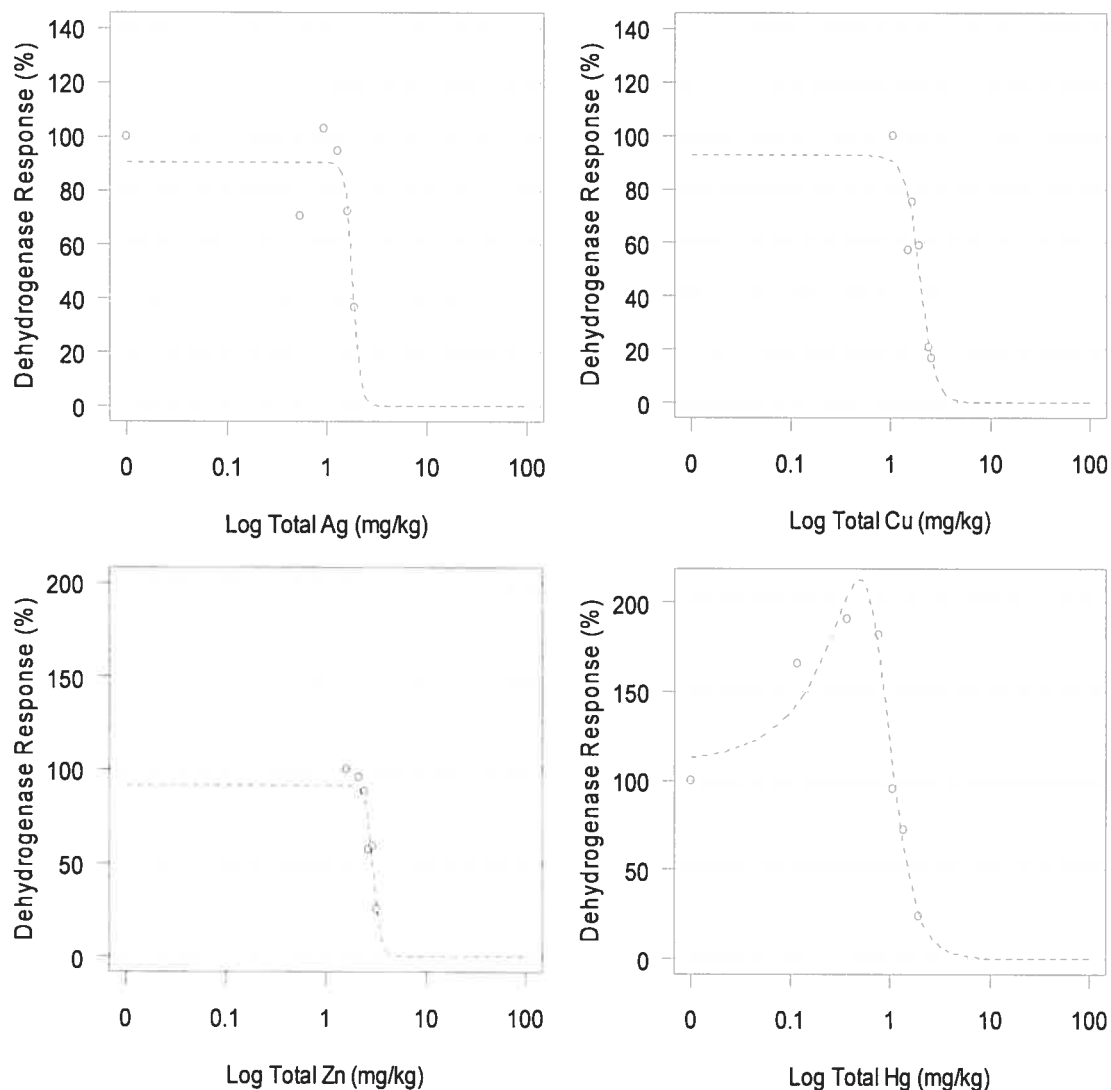


Figure 14. Dose-response curves of dehydrogenase activity as a function of the mean log total dose of 4 replicates (RSD < 10 %) for each individual total metal for the forest soil.

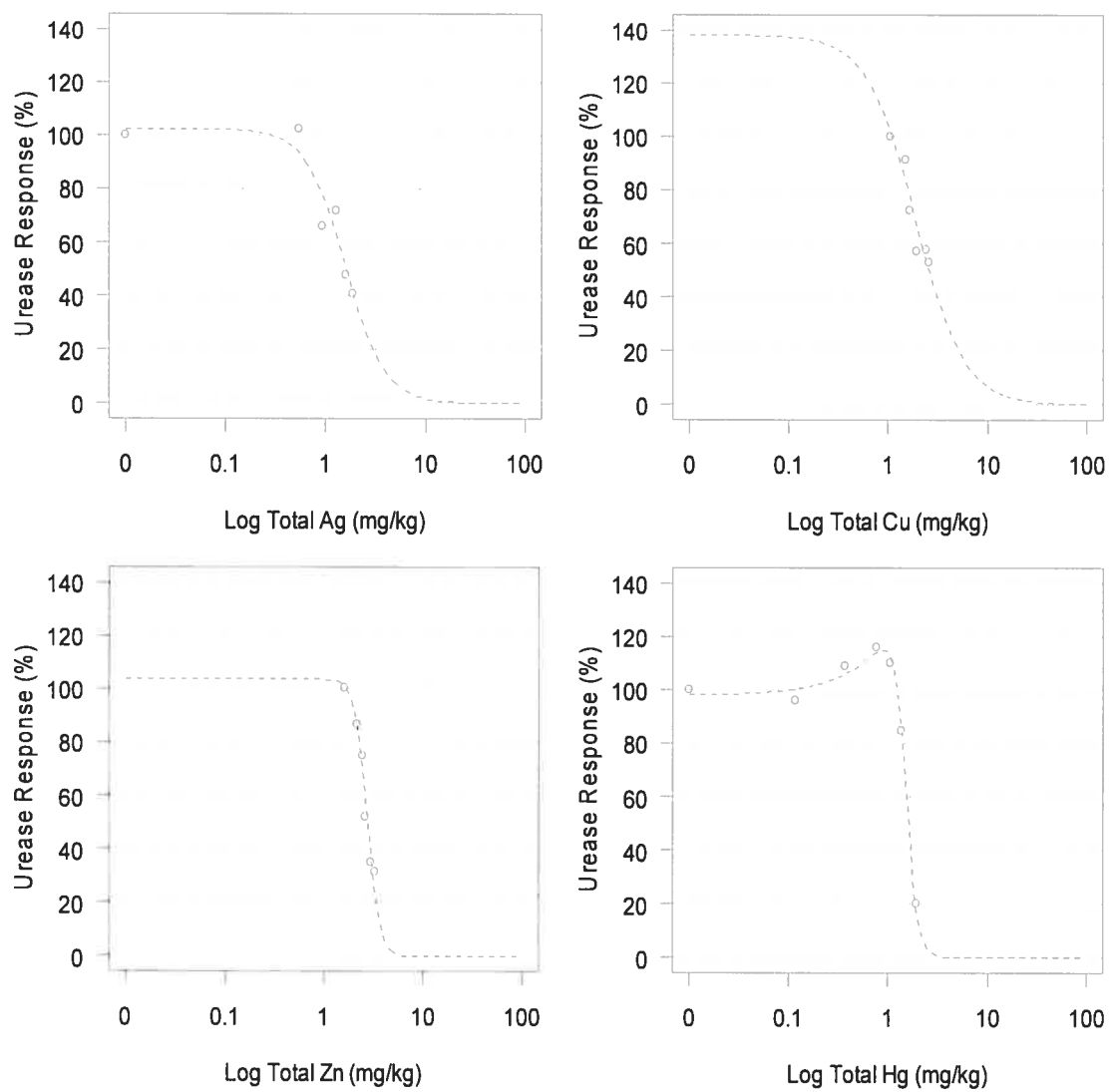


Figure 15. Dose-response curves of urease activity as a function of the mean log total dose of 4 replicates (RSD < 10 %) for each individual total metal for the forest soil.

Table VIII. Estimated dose-response curve parameters (\pm 95% CI) for single metals of each bioassay in the forest soil^a

Component	E _{CON} (%) ^b	m ^c	EC ₂₅ ^d	EC ₅₀ ^d
Dehydrogenase				
<i>Total metals</i>			mgkg ⁻¹	mgkg ⁻¹
Ag	90 (5)	11.4 (3.2)	44 (38-51)	64 (60-69)
Cu	93 (14)	5.7 (1.5)	42 (26-68)	92 (64-133)
Hg	110 (9)	3.6 (0.3)	16 (14-18)	27 (23-31)
Zn	91 (10)	11.9 (4.2)	496 (335-733)	905 (726-1128)
<i>Dissolved metals</i>			µg L ⁻¹	µg L ⁻¹
Ag	90 (4)	11.0 (3.2)	37 (32-43)	54 (50-58)
Cu	87 (12)	7.2 (2.3)	38 (25-56)	69 (52-90)
Hg	101 (12)	3.6 (0.4)	27 (22-33)	50 (38-66)
Zn	89 (11)	9.7 (4.9)	162 (93-284)	299 (220-407)
Urease				
<i>Total metals</i>			mgkg ⁻¹	mgkg ⁻¹
Ag	102 (5)	2.2 (0.4)	9 (7-11)	36 (29-44)
Cu	138 (31)	1.8 (0.6)	10 (3-30)	74 (23-235)
Hg	98 (3)	7.4 (0.6)	27 (25-29)	40 (38-42)
Zn	103 (2)	7.0 (0.6)	198 (182-215)	488 (461-517)
<i>Dissolved metals</i>			µg L ⁻¹	µg L ⁻¹
Ag	103 (3)	1.6 (0.2)	5 (4-5)	23 (19-27)
Cu	142 (29)	2.0 (0.5)	9 (4-19)	44 (19-100)
Hg	98 (3)	35.2 (2.9)	61 (60-62)	67 (66-68)
Zn	127 (10)	4.4 (0.6)	33 (26-43)	89 (74-108)

^a Parameters calculated using equation (20) from R package software (R development Core Team, 2005)

^b Control response

^c Slope parameter

^d Concentration inhibiting 25% or 50% of the enzyme activity.

Table IX. Estimated dose-response curve parameters (\pm 95% CI) for single metals of each bioassay in the agricultural soil^a

Component	E _{CON} (%) ^b	m ^c	EC ₂₅ ^d	EC ₅₀ ^d
Dehydrogenase				
<i>Total metals</i>			mgkg ⁻¹	mgkg ⁻¹
Ag	91 (2)	9.6 (2.2)	35 (31-40)	54 (50-58)
Cu	107 (5)	6.5 (0.5)	107 (92-125)	252 (224-284)
Hg	92 (4)	6.0 (0.5)	21 (18-24)	39 (35-44)
Zn	112 (8)	9.7 (1.2)	448 (369-544)	933 (808-1077)
<i>Dissolved metals</i>			μg L ⁻¹	μg L ⁻¹
Ag	94 (3)	12.6 (1.8)	79 (73-84)	117 (110-124)
Cu	105 (5)	8.7 (0.7)	222 (196-251)	458 (419-502)
Hg	95 (13)	11.3 (2.0)	127 (82-197)	209 (164-267)
Zn	111 (7)	6.5 (0.7)	1384 (1005-1905)	5243 (4090-6722)
Urease				
<i>Total metals</i>			mgkg ⁻¹	mgkg ⁻¹
Ag	99 (2)	1.2 (0.1)	8 (7-10)	193 (155-242)
Cu	112 (20)	2.6 (0.9)	49 (16-150)	369 (145-944)
Hg	99 (3)	1.6 (0.3)	15 (12-20)	218 (131-362)
Zn	99 (5)	9.9 (1.1)	582 (497-681)	1233 (1110-1370)
<i>Dissolved metals</i>			μg L ⁻¹	μg L ⁻¹
Ag	100 (2)	2.4 (0.2)	35 (31-40)	267 (236-303)
Cu	96 (6)	3.6 (0.4)	234 (158-348)	1673 (1196-2340)
Hg	100 (4)	1.4 (0.6)	51 (25-105)	7112 (645-78 361)
Zn	95 (3)	6.8 (0.7)	3175 (2476-4073)	12961 (11 004-15 267)

^a Parameters calculated using equation (20) from R package software (R Development Core Team, 2005)

^b Control response

^c Slope parameter

^d Concentration inhibiting 25% or 50% of the enzyme activity.

The EC_{50} and EC_{25} threshold concentrations presented in Table VIII and Table IX indicate that silver and mercury are usually the metal producing the highest toxicity. In contrast, Zn presents the lowest toxicity. For example, in Table IX, 27 mg Hg kg^{-1} are needed to inhibit half of the dehydrogenase response in comparison to 905 mg kg^{-1} for Zn.

Dose-response curves are heterogeneous with slope parameters reaching a 10-fold variability. Slopes with deviation around or higher than 10% are also considered to be heterogeneous (de Zwart and Posthuma, 2005).

Observed mixture toxicities

We compared dissolved metal concentrations measured in the forest soil with those measured in the agricultural soil. Both soils have total metal concentrations within an order of magnitude except for total mercury concentrations in the forest soil which are higher. Metal concentrations are illustrated in Table X and Table XI. Results from the comparison show that dissolved metal concentrations are 30 to 1500% higher in the agricultural soil than in the forest soil; even with the spiked mercury soil which has a higher total content in the latter soil. Then, we compared the observed toxicity of combinations between soils. Figure 16 represents the dehydrogenase response as a function of the metal combinations. Results show that we measured a lower enzymatic response in the agricultural soil. Same pattern is observed with the urease assay.

Mixtures of Cu and Hg yield an hormetic response in the forest soil as illustrated in Table X. Dehydrogenase response gives 121% and urease response gives 103%. As mentioned earlier, this hormesis trend with mercury is reported in the literature.

Ternary or quaternary mixtures are not significantly more toxic than binary mixtures. We also observed a higher toxicity with mixtures containing silver for both microbial assays and soils.

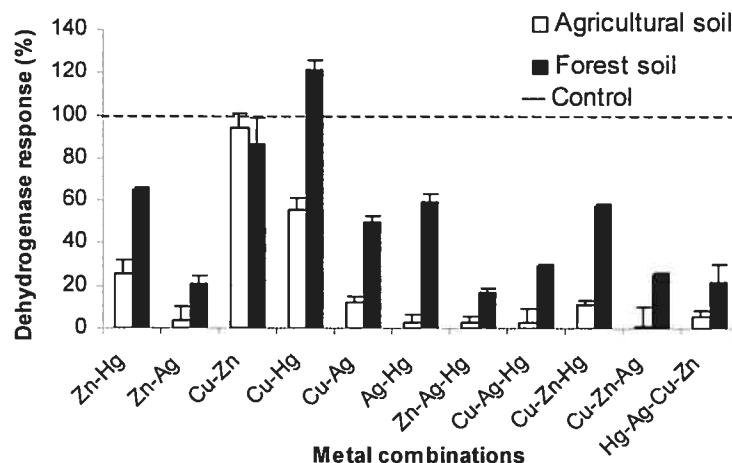


Figure 16. Comparison of Dehydrogenase responses as a function of total metal combinations between an agricultural and a forest soil. Total metal concentrations are in the same order of magnitude except for total mercury in the forest soil which is higher. Responses in the forest soil are less toxic than in the agricultural soil.

Predicted mixture toxicity

From the slope parameters in Table VIII and Table IX, we observe that the curves are not parallel. Components with different slopes usually indicate different modes of action on the biological target. Therefore, we used the Bliss independence model to predict mixture toxicity and this was also confirmed in an earlier study for Cd, Cu, Pb soil combinations (Chaperon and Sauvé, 2005a; Chaperon and Sauvé, 2005b). Results are presented in Table X and XI for the forest and agricultural soil respectively. Prediction were obtained by the application of Equation 22.

The comparison of the predicted data and observed data was not clear. In fact, conclusion from the fractional product for the agricultural soil in Table XI reveals an overall Bliss synergism for either total metal or dissolved metal exposure. In contrast, for the forest soil in Table X, exposure of total metal to the enzymes of the forest soil yield overall Bliss antagonism. Then, the exposure of dissolved metal to the enzymes are contradictory and yield Bliss synergism for dehydrogenase but Bliss antagonism for urease.

Table X. Comparison of predicted and measured responses for enzyme assays using Bliss independence models for the exposure of total and dissolved metals in the forest soil.

Mixture Concentrations				Calculated effect for individual metals (%) ^a				Mean measured effect for the combinations (%) ^b (± 95% CI)	Predicted effect from Bliss independence model (%) ^c	Conclusion from fractional product comparison ^d
Total metals (mgkg ⁻¹)				Ag	Cu	Hg	Zn			
Ag	Cu	Hg	Zn	Ag	Cu	Hg	Zn			
Dehydrogenase										
		35	356			45	78	65(7)	37	BANT
30			373	82			77	21(6)	66	BSYN
	83		364		50		77	86(6)	40	BANT
	87	37			48	43		121(6)	22	BANT
32	82			81	50			50(3)	42	BANT
26		32		85		48		59(4)	43	BANT
31		35	373	82		45	77	17(2)	31	BSYN
29	91	35		83	47	45		29(6)	19	BANT
	92	27	329		46	54	80	57(2)	22	BANT
27	83		453	84	50		71	25(10)	32	NS
27	77	30	348	84	52	50	78	22(2)	19	NS
Urease										
		35	356			57	61	55(3)	31	BANT
30			373	54			60	47(4)	29	BANT
	83		364		67		60	98(6)	37	BANT
	87	37			67	39		103(5)	24	BANT
32	82			53	68			19(1)	33	BSYN
26		32		57		63		28(2)	32	BSYN
31		35	373	54		57	60	50(4)	15	BANT
29	91	35		55	66	57		34(1)	17	BANT
	92	27	329		66	73	63	32(1)	25	BANT
27	83		453	56	67		54	31(2)	17	BANT
27	77	30	348	56	68	66	62	49(7)	12	BANT
Dissolved metals (µg L ⁻¹)										
Dehydrogenase										
		16	196			107	60	65(7)	70	NS
8			165	90			66	21(6)	65	BSYN
	39		179		64		63	86(6)	44	BANT
	53	61			53	45		121(6)	26	BANT
6	50			90	55			50(3)	55	BSYN
14		5		89		195		59(4)	190	BSYN
7		5	139	90		197	71	17(2)	151	BSYN
7	52	7		90	53	172		29(6)	99	BSYN
	54	6	113		52	186	76	57(2)	88	BSYN
14	54		663	89	53		20	25(10)	11	BANT
14	55	7	151	89	51	169	69	22(2)	69	BSYN
Urease										
		16	196			115	42	55(3)	41	BANT
8			165	68			46	47(4)	27	BANT
	39		179		73		44	98(6)	28	BANT
	53	61			68	56		103(5)	32	BANT
6	50			72	69			19(1)	42	BSYN
14		5		58		107		28(2)	53	BSYN
7		5	139	71		107	51	50(4)	28	BANT
7	52	7		70	68	110		34(1)	38	BSYN
	54	6	113		67	109	56	32(1)	30	BANT
14	54		663	58	67		21	31(2)	6	BANT
14	55	7	151	59	67	110	48	49(7)	13	BANT

^a From the logistic and Brain-Cousens equations (20) and (21).

^b Mean observed response of 4 replicates with the 95 % confidence interval (CI).

^c Each calculated response for individual metals were divided by the average of the control response, then the fractional response were multiplied following equation (22), and this product was multiplied by the average control response to yield the predicted data.

^d Measured responses greater and lower than the predicted data mean Bliss antagonism (BANT) and Bliss synergism (BSYN) respectively, NS means insignificant at 95 % CI.

Tableau XI. Comparison of predicted and measured responses for enzyme assays using Bliss independence models for the exposure of total and dissolved metals in the agricultural soil.

Mixture Concentrations				Calculated effect for individual metals (%) ^a				Mean measured effect for the combinations (%) ^b (± 95% CI)	Predicted effect from Bliss independence model (%) ^c	Conclusion from fractional product comparison ^d
Total metals (mgkg ⁻¹)				Ag	Cu	Hg	Zn			
Ag	Cu	Hg	Zn	Ag	Cu	Hg	Zn			
Dehydrogenase										
30		14	397			81	87	25(1)	70	BSYN
			386	75			88	4(3)	66	BSYN
	84		388		87		88	94(13)	76	BANT
26	86	13			86	83		55(5)	70	BSYN
	75			80	89			12(3)	71	BSYN
25		15		81		80		3(4)	64	BSYN
31		22	406	73		67	86	3(2)	42	BSYN
32	98	22		72	83	67		3(1)	39	BSYN
	110	18	461		80	75	82	11(1)	48	BSYN
26	83		345	80	87		92	1(1)	63	BSYN
35	103	21	445	69	81	69	83	6(8)	31	BSYN
Urease										
30		14	397			70	80	36(3)	55	BSYN
			386	63			81	30(3)	49	BSYN
	84		388		55		81	59(6)	44	BANT
26	86	13			76	71		50(2)	53	BSYN
	75			64	78			35(4)	49	BSYN
25		15		64		69		29(1)	43	BSYN
31		22	406	62		64	80	19(1)	30	BSYN
32	98	22		62	74	64		25(3)	28	BSYN
	110	18	461		73	67	77	36(1)	36	NS
26	83		345	64	77		83	26(2)	39	BSYN
35	103	21	445	61	74	65	68	30(2)	19	BANT
Dissolved metals (µg L ⁻¹)										
Dehydrogenase										
54		91	1107			83	87	25(1)	71	BSYN
			1237	85			85	4(3)	72	BSYN
	241		1107		76		87	94(13)	66	BANT
56	272	79			72	86		55(5)	61	BSYN
	292			84	69			12(3)	58	BSYN
66		78		79		86		3(4)	67	BSYN
61		75	1103	81		87	88	3(2)	60	BSYN
71	281	77		75	71	87		3(1)	45	BSYN
	285	55	963		70	91	90	11(1)	56	BSYN
90	255		923	63	74		90	1(1)	41	BSYN
136	335	103	1141	38	64	79	87	6(8)	16	BSYN
Urease										
54		91	1107			71	85	36(3)	62	BSYN
			1237	70			83	30(3)	59	BSYN
	241		1107		72		85	59(6)	62	NS
56	272	79			70	72		50(2)	52	NS
	292			69	69			35(4)	49	BSYN
66		78		67		72		29(1)	50	BSYN
61		75	1103	68		73	85	19(1)	44	BSYN
71	281	77		66	70	72		25(3)	35	BSYN
	285	55	963		70	75	86	36(1)	46	BSYN
90	255		923	63	71		86	26(2)	40	BSYN
136	335	103	1141	58	68	71	84	30(2)	25	BANT

^a From the logistic and Brain-Cousens equations (20) and (21).

^b Mean observed response of 4 replicates with the 95 % confidence interval (CI).

^c Each calculated response for individual metals were divided by the average of the control response, then the fractional response were multiplied following equation (22), and this product was multiplied by the average control response to yield the predicted data.

^d Measured responses greater and lower than the predicted data mean Bliss antagonism (BANT) and Bliss synergism (BSYN) respectively, NS means insignificant at 95 % CI.

3.6 Discussion

Spiked soils have been leached in order to mimic field conditions where leaching is common. Soil lixiviation has been studied by Smolders et al. (2003). They reported that the addition of $200 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ as ZnCl_2 increases the soil solution ionic strength by about 0.05 M , i.e. considerably above the soil solution ionic strength in soils of temperate climate (about 0.02 M). They also observed that microbial processes were sensitive to the added Zn in laboratory-spiked soils that are not leached. Thus, we leached the soils to remove the excess of anions.

Two enzyme assays were chosen as biological targets because they are sensitive, rapid, inexpensive and reliable but also for their mechanism differences. Indeed, dehydrogenase is an intracellular enzyme and is active only inside intact, living cells, while urease is an extracellular enzyme (Brookes, 1995). Chander and Brookes (1991) suggested that the assay for dehydrogenase activity is subject to interference from Cu in soil, because Cu prevents the red colour development of the released product triphenyl formazan. Their study tested the color reaction using a range of $0\text{--}100 \text{ mg Cu L}^{-1}$, a decrease in absorbance of triphenyl formazan of 5% at a concentration of 1 mg Cu L^{-1} was reported. All the Cu content in the soil solution extracts from the present study contains less than $< 0.8 \text{ mg Cu L}^{-1}$. Therefore, we conclude that this abiotic reaction does not interfere with our results.

Soils spiked with metal salts clearly demonstrated a negative, concentration-related effect on the enzyme activities. For each soil, we used Ag_2SO_4 as a positive control in order to limit microbial activity and to correct for any abiotic response. This biocide was also used by Qureshi et al. (2003) and they reported that silver was uniformly effective at limiting microbial activity. Enzyme toxicities of the individual metals obtained in the present study corroborate with the data reported by Bååth (1989). However, comparison is limited because soils, methods and physicochemical characteristics are heterogeneous. The EC_{50} thresholds for urease with dissolved Hg appears to be incoherent because mercury is known to be one of the most toxic metals and our results revealed a toxicity lower than copper which is unusual. Furthermore,

the 95% confident interval for urease in the agricultural soil is relatively large and on this basis total mercury seems to have a better fit with the toxicity response.

Curve comparisons revealed heterogeneous slopes which tend to suggest that metals exhibit different rather than similar mode of action. Faust et al. (2003) have demonstrated that substances with strictly different mechanisms of action have accurate prediction with the Bliss independence model. The Loewe additivity model, the other principal model used to predict mixture toxicity and also reported as concentration addition, overestimated the toxicity. We therefore choose to use the Bliss independence model to predict mixture toxicity. Sharma et al. (1999) and Preston et al. (2000) also used this approach because it appears to be simple and appropriate for this kind of study.

Comparison between predicted and observed data confirm the previously reported inconsistency of the joint effects in soils (Khalil et al., 1996; Van Gestel et al., 1997; Sharma et al., 1999). In the agricultural soil, for the most part we observed a synergistic mixture toxicity observed. In contrast, in the forest soil, we mostly observed antagonistic effect with total metals, variable effects with for the dehydrogenase response with dissolved metals and again an overall antagonistic effect for the response of urease to the dissolved metals. The difference between the synergistic trend for one soil and the antagonistic trend for the other soil may be explained by several parameters. However, the lower organic matter content and the lower pH in the agricultural soil highlight the influence of those parameters. In fact, the forest soil contains 21 % of organic matter and the agricultural soil only 6 %. Organic matter has a large capacity to sequester metals. Silver, mercury and copper are strongly bound to organic matter in the environment. Furthermore, the higher pH in the forest soil will also contribute to enhance binding of metals with dissolved organic ligands in the soil solution. Therefore, we suggest that metals from the forest soil will be less bioavailable for the enzymes than for the agricultural soil.

Dissolved metals seems to be more variable than total metals on the basis of the mercury EC_{50} for urease and on the variable conclusions obtained with the fractional product from Table X. Smolders et al. (2003) also reported that total EC_{50} 's are less variable than soil solution EC_{50} or free metal activities when combining data.

Conclusions

In summary, a study of the individual and mixture toxicities of trace metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to the enzymes dehydrogenase and urease in soil was conducted. Dose-response curves of the individual metals showed heterogeneous trends which suggest different rather than similar mechanisms of action on the enzymes studied. The Bliss independence model was used to predict the mixture toxicity. Comparison between the predicted and the observed data showed the inconsistency of the joint effect in soils. More research on the toxicity of mixtures is needed to elucidate the behavior of metal combinations in soils. However, the results tend to suggest that mixture toxicity of metals cannot be predicted assuming that the toxicity of the individual metals is independent of the other metals in the mixture.

Acknowledgements

The authors thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies for their financial support.

3.7 References

- Bååth, E., 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air, and Soil Pollution* 47, 335-379.
- Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology* 26, 585-615.
- Brain, P., Cousens, R., 1989. An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research* 29, 93-96.

- Brookes, P.C., 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils* 19, 269-279.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2003. Inorganics and hormesis. *Critical Reviews in Toxicology* 33, 215-304.
- Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME), 2003. Canadian Environmental Quality Guidelines. Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg, MA.
- Chaperon, S., Sauvé, S., 2005a. Joint Toxicity of Cadmium, Copper and Lead on Urease and Dehydrogenase Activity in Soils. *Proceedings, 8th International Conference in the Biogeochemistry of Trace Elements (ICOBTE)*, Adelaide, SA, Australia, April 3-7.
- Chaperon, S., Sauvé, S., 2005b. Toxicity Interactions of Cadmium, Copper and Lead on Urease and Dehydrogenase Activity in Soils. *Proceedings, SETAC 26th Annual Meeting in North America*. Baltimore, MA, USA, November, 13-17.
- Chander, K., Brookes, P.C., 1991. Is the dehydrogenase assay invalid as a method to estimate microbial activity in copper-contaminated soils?. *Soil Biology & Biochemistry* 23, 909-915.
- Chou, T-C, Talalay, P., 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation* 22, 27-55.
- de Zwart, D., Posthuma, L., 2005. Complex mixture toxicity for single and multiple species: proposed methodologies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 2665-2676.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L.H., 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquatic Toxicology* 63, 43-63.
- Hendershot, W.H., Lalonde, H., 1993a. Soil reaction and exchangeable acidity. In: Carter, M.R. (Ed.), *Soil Sampling and Methods Analysis*. Lewis Publishers, Ottawa, ON, pp. 141-145.

- Hendershot, W.H., Lalonde, H., 1993b. Ion exchange and exchangeable cations. In: Carter, M.R. (Ed.), *Soil Sampling and Methods Analysis*. Lewis Publishers, Ottawa, ON, pp. 167-176.
- International Standard Organization (ISO), 1993. *Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida)*. Part 2: Determination of effects on reproduction. No.11268-2. ISO, Geneve.
- Kandeler, E., 1996. Urease activity by colorimetric technique. In: Schinner, F., Kandeler, E., Öhlinger, R., Margesin, R. (Eds.), *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 171-174.
- Kandeler, E., Kampichler, C., Horak, O., 1996. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils* 23, 299-306.
- Khalil, M.A., Abdel-Lateif, H.M., Bayoumi, B.M., Van Straalen N.M., 1996. Analysis of separate and combined effects of heavy metals on the growth of *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta; Annelida), using the toxic unit approach. *Applied Soil Ecology* 4, 213-219.
- Könemann, W.H., Pieters, M.N., 1996. Confusion of concepts in mixture toxicology. *Food Chemistry and Toxicology* 34, 1025-1031.
- Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Effect of combinations: mathematical basis of problem. *Archiv for Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 114, 313-326.
- Norwood, W.P., Borgmann, U., Dixon, D.G., Wallace, A., 2003. Effects of metal mixtures on aquatic biota : a review of observations and methods. *Human and Ecological Risk Assessment* 9, 795-811.
- Plette, A.C.C., Nederlof, M.M., Temminghoff, E.J.M., Van Riemsdijk, W.H., 1999. Bioavailability of heavy metals in terrestrial and aquatic systems: a quantitative approach. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 1882-1890.
- Preston, S., Coad, N., Townend, J., Killham, K., Paton, G.I., 2000. Biosensing the acute toxicity of metal interactions: Are they additive, synergistic, or antagonistic?. *Environ Toxicology and Chemistry* 19, 775-780.

- Qureshi, S., Richards, B.K., Hay, A.G., Tsai C.C., McBride, M.B., Baveye, P., Steenhuis, T.S., 2003. Effect of microbial activity on trace element release from sewage sludge. *Environmental Science & Technology* 37, 3361-3366.
- R Development Core Team, 2005. R 2.1.0: A Language and Environment for Statistical Computing®. R Foundation for Statistical Computing, Vienna <http://www.r-project.org> (viewed November 5, 2005).
- Sauvé, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Senécal, L., Goudreau, P., Fournier, M., 2002. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology* 58, 189-200.
- Sharma, S.S., Schat, H., Vooijs, R., Van Heerwaarden, L.M., 1999. Combination toxicology of copper, zinc, and cadmium in binary mixtures: concentration-dependent antagonistic, nonadditive, and synergistic effects on root growth in *Silene vulgaris*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 348-355.
- Smolders, E., McGrath, S.P., Lombi, E., Karman, C.C., Bernhard, R., Cools, D., Van den Brande, K., Van Os, B., Walrave, N., 2003. Comparison of toxicity of zinc for soil microbial processes between laboratory-contaminated and polluted field soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 2592-2598.
- Stuczynski, T.I., McCarty, G.W., Siebielec, G., 2003. Response of soil microbiological activities to cadmium, lead, and zinc salts amendments. *Journal of Environmental Quality* 32, 1346-1355.
- Tabatabai, M.A., 1994. Soil enzymes. In: Weaver, R.W., Angel, J.S., Bottomley, P.S. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2—Microbiological and Biochemical Properties*. SSSA Book Series No. 5, Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 775-833.
- Tabatabai, M.A., Dick, W.A., 2002. Enzymes in soil. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker, New York, NY, pp. 567-596.
- Tiessen, H., Moir, J.O., 1993. Total organic carbon. In: Carter, M.R. (Ed.), *Soil Sampling and Methods Analysis*. Lewis Publishers, Ottawa, ON, pp. 187-200.

Van Gestel, C.A.M., Hensbergen, P.J., 1997. Interaction of Cd and Zn toxicity for *Folsomia candida willem* (collembola: isotomidae) in relation to bioavailability in soil. Environmental Toxicology and Chemistry 16, 1177-1186.

4 CONCLUSION

La première étude portant sur l'action conjuguée du cadmium, du cuivre et du plomb sur l'activité enzymatique d'un sol forestier a permis de témoigner de l'importance des mesures de spéciation en chimie de l'environnement. Les résultats de l'expérience ont montré que le mélange binaire de Pb et de Cu entraînait une diminution significative de l'activité du Cu^{2+} libre et de Pb^{2+} libre par rapport à un sol monocontaminé avec les concentrations respectives des métaux. Cette diminution de métaux présents sous forme libre en solution a engendré une stimulation de l'activité enzymatique. Ainsi, on a observé de la compétition entre les métaux pour les différents sites de complexation des ligands de la matière organique et une répercussion sur la toxicité enzymatique.

Par la suite, on a comparé la toxicité observée à la toxicité prédite avec deux modèles toxicologiques. La sélection du modèle approprié s'est effectuée en considérant l'hétérogénéité des pentes des courbes dose-réponses et en considérant la corrélation des données prédites avec celles observées. Ainsi, le modèle de l'indépendance de Bliss a été retenu. Dans tous les cas, les réponses observées étaient supérieures à celles prédites. Par conséquent on a obtenu un effet antagoniste pour les mélanges.

La deuxième étude portait sur l'effet des métaux combinés (Ag, Cu, Hg, Zn) sur l'activité enzymatique d'un sol forestier-sablonneux et d'un sol agricole. Dans ce cas-ci les concentrations en métaux totaux et en métaux dissous ont été mesurées. Des courbes dose-réponses non-parallèles pour les deux sols ont été obtenus supposant que le modèle de l'indépendance de Bliss était plus approprié pour prédire l'effet des mélanges de métaux. Les conclusions obtenues en comparant les effets prédits et les effets mesurés en fonction des concentrations en métaux totaux indiquent des effets antagonistes pour le sol forestier-sablonneux et des effets synergiques pour le sol agricole. Les conclusions obtenues en comparant les effets prédits et les effets mesurés en fonction des concentrations en métaux dissous étaient plus variables. Il

serait important de mesurer l'activité des ions métalliques libres pour vérifier la présence d'une corrélation avec la toxicité enzymatique.

Des recherches supplémentaires sont nécessaires concernant la combinaison des métaux puisque nous obtenons différents résultats pour des sols distincts. Dans la littérature on retrouve également une grande hétérogénéité des résultats ce qui montre l'importance d'investir dans ce champ d'étude. Une connaissance approfondie des effets des mélanges de polluants sur les processus microbiens des sols nous permettrait d'améliorer la définition des critères de qualité des sols contaminés.

5 BIBLIOGRAPHIE

- Alef, K., Nannipieri, P., 1995. Urease Activity. Dans: Alef, K., Nannipieri, P. (Eds), Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, San Diego, CA, pp. 316-320.
- Alloway, B.J., 1990. Cadmium. Dans: Alloway, B.J. (Ed.), Heavy Metals in Soils. John Wiley & Sons, Inc., Somerset, NJ, pp. 100-124.
- Alloway, B.J., 1990. The origin of heavy metals in soils. Dans : Alloway, B.J. (Ed.), Heavy metals in soils, John Wiley & Sons, Inc., Somerset, NJ, pp. 29-39.
- Altenburger, R., Boedeker, W., Faust, M., Grimme, L.H., 1996. Regulations for combined effects of pollutants : consequences from risk assessment in aquatic toxicology. Food Chem. Toxicol. 34, 1155-1157.
- Altenburger, R., Schmitt, H., Schüürmann, G., 2005. Algal toxicity of nitrobenzenes: combined effect analysis as a pharmacological probe for similar modes of interaction. Environ. Toxicol. Chem. 24, 324-333.
- Bååth, E., 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). Water Air Soil Pollut. 47, 335-379.
- Baker, D.E., 1990. Copper. Dans: Heavy Metal in Soils. John Wiley & Sons, Inc., Somerset, NJ, pp. 151-175.
- Berenbaum, M.C., 1989. What is synergy?. Pharmacol. Rev. 41, 93-141.
- Bianchini, A., Wood, C.M., 2003. Mechanism of acute silver toxicity in *daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem. 22, 1361-1367.
- Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. Ann. Appl. Biol. 26, 585-615.
- Brain, P., Cousens, R., 1989. An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Res. 29, 93-96.
- Bremner, J.M., Mulvaney, R.L., 1978. Urease activity in soils. Dans: Burns, R.G. (Ed.), Soil Enzymes. Academic Press, New York, NY, pp. 149-195.
- Calabrese, E.J., Baldwin, A., 2003. Hormesis: the dose-response revolution. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 43, 175-197.

- Campbell, P.G.C., 1995. Interactions between trace metals and aquatic organism: a critique of the free-ion activity model. Dans: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, pp. 45-102.
- Cassee, F.R., Groten, J.P., van Bladeren, P.J., Feron, V.J., 1998. Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. Crit. Rev. Toxicol. 28, 73-101.
- CCME. (Le conseil canadien des ministres de l'environnement), 2003. Recommendations canadiennes pour la qualité de l'environnement. Le conseil canadien des ministres de l'environnement, Winnipeg, MA.
- CEAEQ, (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec), 1998. Teneurs de fond (critères A) pour les métaux et métalloïdes. Développement durable, environnement et parcs, Québec, QC
http://www.mddep.gouv.qc.ca/sol/terrains/politique/annexe_2_tableau_2.htm (vu le 16 novembre 2005).
- Chander, K., Brookes, P.C., 1991. Is the dehydrogenase assay invalid as a method to estimate microbial activity in copper-contaminated soils?. Soil Biol. Biochem. 23, 909-915.
- Cheng, T., Allen, H.E., 2001. Prediction of uptake of copper from solution by lettuce (*Lactuca sativa romance*). Environ. Toxicol. Chem. 20, 2544-2551.
- Christensen, T.H., Haung, P.M., 1999. Solid phase cadmium and the reactions in aqueous cadmium with soil surfaces. Dans: McLaughlin, M.J., Singh, B.R. (Eds.), Cadmium in Soils and Plants. Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA, pp. 65-96.
- Crosby, D.G., 1998. Environmental Toxicology and Chemistry. Oxford University Press, New York, NY.
- Deneer, J., Seinen, W., Hermens, J.L.M., 1988. Growth of *Daphnia magna* exposed to mixtures of chemicals with diverse modes of action. Ecotoxicol. Environ. Saf. 15, 72-77.

- Di Torro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2383-2396.
- Environnement Canada, 1994. Canadian Soil Quality Criteria For Contaminated Site, Ecological Effects: Copper, Supporting Document—Draft Report, September 1994. Guidelines Division, Science Policy and Environmental Quality Branch, Environment Canada, Ottawa, ON.
- Environnement Canada, 1996a. Canadian Soil Quality Guidelines for Cadmium: Environmental, Supporting Document—Final Draft, December 1996. Guidelines Division, Science Policy and Environmental Quality Branch, Environment Canada, Ottawa, ON.
- Environnement Canada, 1996b. Canadian Soil Quality Guidelines for Zinc: Environmental, Supporting Document—Final Draft, December 1996. Guidelines Division, Science Policy and Environmental Quality Branch, Environment Canada. Ottawa, ON.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L.H., 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquat. Toxicol.* 63, 43-63.
- Frankenberger, W.T., Johanson, J.B., 1982. Effect of pH on enzyme stability in soils. *Soil Biol. Biochem.* 14, 433-437.
- Gabriel, M.C., Williamson, D.G., 2004. Principal biogeochemical factors affecting the speciation and transport of mercury through the terrestrial environment. *Environ. Geochem. Health* 26, 421-434.
- Greco, W.R., Bravo, G., Parsons, J.C., 1995. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol. Rev.* 47, 331-385.
- Groten, J.P., Feron, V.J., Sühnel, J., 2001. Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 316-322.
- Hermens, J., Leeuwangh, P., 1982. Joint toxicity of mixtures of 8 and 24 chemicals to the guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 6, 302-310.

- Jonker, M.J., Sweijen, R.A.J.C., Kammenga, J.E., 2004. Toxicity of simple mixtures to the nematode *Caenorhabditis elegans* in relation to soil sorption. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 480-488.
- Kandeler, E., Gerber, H., 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* 6, 68-72.
- Kiekens, L., 1990. Zinc. Dans: Alloway, B.J. (Ed.), *Heavy Metals in Soils*. John Wiley & Sons, Inc., Somerset, NJ, pp. 261-279.
- Kodell, R.L., Pounds, J.G., 1991. Assessing the toxicity of mixtures of chemicals. Dans: Krewski, D., Franklin, C. (Eds.), *Statistics in Toxicology*. Gordon and Breach Science Publishers, New York, NY, pp. 559-591.
- Könemann, W.H., Pieters, M.N., 1996. Confusion of concepts in mixture toxicology. *Food Chem. Toxicol.* 34, 1025-1031.
- Kortenkamp, A., Altenburger, R., 1999. Approaches to assessing combination effects of oestrogenic environmental pollutants. *Sci. Total Environ.* 233, 131-140.
- Ladd, J.N., 1978. Origin and range of enzymes in soil. Dans: Burns, R.G. (Ed.), *Soil Enzymes*. Academic Press, New York, NY, pp. 1-43.
- Ladd, J.N., 1985. Soil enzymes. Dans: Vaughan D., Malcom, R.E. (Eds.), *Soil Organic Matter and Biological activity*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, Pays-Bas, pp. 175-221.
- Lenhard, G., 1956. Die Dehydrogenaseaktivität des bodens als mass für die mikroorganismen-tätigkeit im boden. *Z Pflanzenernaehr. Dueng. Bodenkd.* 73, 1-11.
- Lindsay, W.L., 1979. *Chemical Equilibria in Soils*. Wiley Interscience, New York, NY.
- Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Effect of combinations: mathematical basis of problem. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 114, 313-326.
- Markus, J., McBratney, A.B., 2001. A review of the contamination of soil with lead II. Spatial distribution and risk assessment of soil lead. *Environ. Int.* 27, 399-411.
- McCarty, G.W., Bremner, J.M., Chac, H.S., 1989. Effects of N-(n-butyl)thiophosphorictriamide on hydrolysis of urea by plant, microbial, and soil urease. *Biol. Fertil. Soils* 8, 123-127.

- McLaughlin, M.J., Singh, B.R., 1999. Cadmium in soils and plants. Dans: McLaughlin, M.J., Singh, B.R. (Eds), *Cadmium in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA, pp. 1-9.
- Moran, L.A., Scrimgeour, K.G., Horton, H.R., Ochs, R.S., Rawn, J.D., 1994. *Biochemistry*, second edition, Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Musch, A., 1996. Toxicity of mixtures. Dans: Niesink, R.J.M., de Vries, J., Hollinger, M.A. (Eds.), *Toxicology : Principles and Applications*. CRC Press, New York, NY, pp. 271-287.
- Nannipieri, P., Landi, L., 2000. Soil enzymes. Dans: Sumner, M.E. (Ed.), *Handbook of Soil Science*. CRC Press, New York, NY, pp. c129-c137.
- Niyogi, S., Wood, C.M., 2004. Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6177-6192.
- Nolan, A.L., Lombi, E., McLaughlin, M.J., 2003. Metal bioaccumulation and toxicity in soils-why bother with speciation?. *Aust. J. Chem.* 56, 77-91.
- Norwood, W.P., Borgmann, U., Dixon, D.G., Wallace, A., 2003. Effects of metal mixtures on aquatic biota : a review of observations and methods. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 9, 795-811.
- Olivier, M.J., 2002. *Chimie de l'environnement*. Les productions Jacques Bernier, Longueuil, QC.
- Parametrix, 1995. *Persistence, bioaccumulation and toxicity of metals and metal compounds*. ICME, Ottawa, ON.
- Pepper, I.L., Gerba, C.P., Brendecke, J.W., 1995. *Environmental Microbiology: a laboratory Manual*. Academic Press, San Diego, CA.
- Plackett, R.L., Hewlett, P.S., 1952. Quantal responses to mixtures of poisons. *J. Roy. Stat. Soc. B Met.* 14, 141-143.
- Preston, S., Coad, N., Townend J., Killham K., Paton, G.I., 2000. Biosensing the acute toxicity of metal interactions: are they additive, synergistic, or antagonistic?. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 775-780.
- Purcell, T.W., Peters, J.J., 1998. Sources of silver in the environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 539-546.

- Ratte, H.T., 1999. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 89-108.
- Ravichandran, M., 2004. Interactions between mercury and dissolved organic matter—a review. *Chemosphere* 55, 319-331.
- Reithel, F.J., 1971. Ureases. Dans: Boyer, P.D. (Ed), *The Enzymes*. Academic Press, New York, NY, pp.1-21.
- Rossel, D., Tarradellas, J., Bitton, G., Morel, J., 1997. Use of enzymes in soil ecotoxicology: a case for dehydrogenase and hydrolytic enzymes. Dans: Tarradellas, J., Bitton, G., Rossel, D. (Eds.), *Soil Ecotoxicology*, CRC Press, New York, NY, pp. 179-206.
- Rotini, O.T., 1935. La trasformazione dell'-urea nell terreno. *Ann Labor. Rie. Ferm. Spallanzani* 3, 143-154.
- Sauvé, S., 2002. Speciation of Metals in Soils. In: Allen, H.E. (Ed), *Bioavailability of Metals in Terrestrial Ecosystems: Importance of Partitioning for Bioavailability to Invertebrates, Microbes, and Plants*. SETAC, Pensacola, FL, pp. 7-37.
- Sauvé, S., Dumestre, A., McBride, M., Hendershot, W., 1998. Derivation of soil quality criteria using predicted chemical speciation of Pb^{2+} and Cu^{2+} . *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1481-1489.
- Sauvé, S., Martinez, C.E., McBride, M., Hendershot, W., 2000. Adsorption of free lead (Pb^{2+}) by pedogenic oxides, ferrihydrite, and leaf compost. *Soil Sci. Am. J.* 64, 595-599.
- Sauvé, S., McBride, M., 1998. Lead phosphate solubility in water and soil suspensions. *Environ. Sci. Technol.* 32, 388-393.
- Sauvé, S., McBride, M.B., Hendershot, W.H., 1995. Ion-selective electrode measurements of copper (II) activity in contaminated soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29, 373-379.
- Scholze, M., Boedeker, W., Faust, M., Backhaus, T., Altenburger, R., Horst Grimme, L., 2001. A general best-fit method for concentration-response curves and the estimation of low-effect concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 448-457.
- Sharma, S.S., Schat, H., Vooijs, R., Van Heerwaarden, L.M., 1999. Combination toxicology of copper, zinc, and cadmium in binary mixtures: concentration-

- dependent antagonistic, nonadditive, and synergistic effects on root growth in *Silene vulgaris*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 348-355.
- Skujins, J., 1978. History of abiotic soil enzyme research. Dans: Burns, R.G. (Ed.), Soil Enzymes. Academic Press, New York, NY, pp. 1-43.
- Slaveykova, V.I., Wilkinson, K.J., 2005. Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: critical review of the biotic ligand model. Environ. Chem. 2, 9-24.
- Smolders, E., McLaughlin, M.J., 1996. Chloride increases cadmium uptake in Swiss chard in a resin-buffered nutrient solution. Soil Sci. Soc. Am. J. 60, 1443-1447.
- Sprague, J.B., 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilising and applying bioassay results. Water Res. 4, 3-32.
- Steinnes, E., 1990. Mercury. Dans: Alloway, B.J. (Ed.), Heavy Metals in Soils. John Wiley & Sons, Inc., Somerset, NJ, pp. 222-236.
- Tabatabai, M.A., 1977. Effects of trace elements on urease activity in soils. Soil Biol. Biochem. 9, 9-12.
- Tabatabai, M.A., 1994. Soil enzymes. Dans: Bigham, J.M. (Ed.), Methods of Soil Analysis: Part 2 Microbiological and Biochemical Properties. SSSA Book Series No. 5, Soil Science of Society of America, Madison, WI, pp. 775-833.
- Tabatabai, M.A., Dick, W.A., 2002. Enzymes in soil. Dans : Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), Enzymes in The Environment : Activity, Ecology and Applications. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp. 567-596.
- USEPA. (U.S. Environmental Protection Agency), 1991. National primary drinking water regulations. Final Rule. Fed. Reg. 56, 3573-3574.
- Van Gestel, C.A.M., Hensbergen, P.J., 1997. Interaction of Cd and Zn toxicity for *Folsomia candida willem* (collembola: isotomidae) in relation to bioavailability in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 1177-1186.
- Welp, G., 1999. Inhibitory effects of the total and water-soluble concentrations of nine different metals on the dehydrogenase activity of a loess soil. Biol. Fert. Soils 30, 132-139.

Yin, Y., Allen, H.E., Li, Y., Huang, C.P., Sanders, P.F., 1996. Adsorption of mercury (II) by soil: Effects of pH, chloride and organic matter. *J. Environ. Qual.* 25, 837-844.

